



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Obtención y Uso de Concentrados de Plaquetas:
Perspectiva Actual**

D. Hermógenes Fernández Muñoz

2018

Hermógenes Fernández Muñoz

hermogenes.fernandez@um.es

DNI: 48504658-G

Directores de tesis:

Dra. Cristina Castilla Llorente

Dra. Inmaculada Heras Fernando

Dr. José Rivera Pozo

Agradecimientos...

Al Dr. Vicente Vicente, por darme la oportunidad de desarrollar esta andadura bajo su tutorización.

A los compañeros clínicos y de laboratorio del Servicio de Hematología y Oncología Médica, del Hospital Morales Meseguer y del Centro Regional de Hemodonación, por su ayuda en la realización del estudio.

A mis compañeros de lorca y mis compañeras de San Javier por lo que me han aportado a lo largo de estos años.

A la Dra. Lozano y Dr. Rivera Caravaca por su apoyo desinteresado en la consecución de este proyecto.

A la Dra. Castilla y Dra. Heras, por sus minuciosas correcciones, enseñanzas y disponibilidad.

Al Dr. Rivera, por un millón de pequeñas cosas, su tiempo, ánimos, correcciones, orientación, y sobretodo por confiar en mí.

A todos los que han colaborado en este proyecto, agradecido.

*Por su infinita paciencia,
a mis padres,
mi hermana
y a Eli.*

Índice

1. Resumen	1
2. Prólogo	7
3. Introducción	11
3.1 Utilización clínica de las transfusiones de plaquetas: Recomendaciones generales	13
3.1.1 Umbral de transfusión de plaquetas profilácticas.....	13
3.1.2 Dosis óptima de transfusión de plaquetas profilácticas	14
3.1.3 Transfusiones de plaquetas profilácticas frente a sólo terapéuticas.....	15
3.1.4 El sangrado como objetivo principal en los ensayos clínicos	17
3.2 Reacción transfusional	19
3.2.1 Reacción transfusional alérgica	20
3.2.2 Prevención.....	28
3.3 Tipos de concentrados de plaquetas	30
3.3.1 Preparación de CPs de aféresis de donante único	30
3.3.2 Obtención de CPs de sangre total	34
3.3.3 Equipos automáticos	37
3.3.4 Equipos de fraccionamiento automatizado.....	38
3.3.5 Preparación de CPs con solución aditiva.....	42
3.3.6 Obtención de CPs lavados.....	43
3.3.7 Producción de CPs inactivados.....	44
3.4 Almacenamiento de concentrados de plaquetas: Justificación y limitaciones	47
3.4.1 Almacenamiento líquido a temperatura ambiente.....	48
3.4.2 Almacenamiento refrigerado.....	49

3.4.3 Almacenamiento criopreservadas	50
3.4.4 Plaquetas liofilizadas.....	52
3.5 Lesión plaquetaria de almacenamiento.....	53
3.5.1 Cambios morfológicos, activación y metabólicos.....	53
3.5.2 Cambios que reflejan daño en la membrana plaquetaria y/o muerte celular	57
3.5.3 Valoración in vitro del estado funcional de las plaquetas almacenadas ...	59
4. Objetivos del Proyecto	63
5. CAPÍTULO I: Evaluación de la calidad de los concentrados de plaquetas buffy coat leucodepleccionados preparados por el sistema automatizado OrbiSac o TACSI	67
Resumen	69
Introducción	71
Material y método	72
Resultados	75
Discusión.....	77
Agradecimientos	80
Tablas	81
6. CAPÍTULO II: Estudio comparativo de la eficacia de las transfusiones profilácticas de concentrados de plaquetas obtenidas por los métodos plasma rico en plaquetas versus buffy-coat, en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos	85
Resumen	87
Introducción	89
Paciente, material y métodos	90
Resultados	93
Discusión.....	96

Conclusiones	100
Agradecimientos	100
Tablas	102
7. CAPÍTULO III: Evaluación de la calidad y eficacia transfusional de los concentrados de plaquetas lavados con solución aditiva Composol® obtenidos por el método de buffy-coat.....	109
Resumen	111
Introducción	113
Material y métodos.....	114
Resultados	118
Discusión.....	120
Agradecimientos	124
Tablas	125
8. Conclusiones	129
9. Difusión de los Resultados Científicos del Proyecto de Tesis Doctoral	133
10. Referencias.....	137
11. Anexo	159

Índice de abreviaturas

AA= ácido araquidónico.

AABB= Asociación Americana de Bancos de Sangre (American Association of Blood Banks).

ADP= adenosina difosfato.

ARN= ácido ribonucleico.

ATP= adenosina trifosfato.

BC= buffy coat.

CCI= incrementos del recuento corregido.

CPs= concentrados de plaquetas.

CsA= ciclosporina A.

DE= desviación estándar.

DMSO= dimetil sulfóxido.

EICH= enfermedad injerto contra huésped.

EICHT= enfermedad de injerto contra huésped transfusional.

ESC= amplitud del cambio de forma (Extent of shape change).

EST= estándar.

FDA= Administración de Alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration).

FOR= reometría de oscilación libre (Free oscillation rheometry).

GP= glicoproteína.

HLA= antígenos leucocitarios humanos.

Hp= haptoglobina.

HPA= antígeno plaquetario humano.

HSR= respuesta al choque osmótico (Hypotonic shock response).

IgA= Inmunoglobulina A.

IgE= Inmunoglobulina E.

IgG= Inmunoglobulina G.

ISBT= Sociedad Internacional de transfusión de sangre (International Society of Blood Transfusion).

IPU= unidad intermedia de plaquetas (interim platelet unit).

ITT= infección transmitida por transfusión.

LAV= lavado.

LDH= lactato deshidrogenasa

LPA= lesión plaquetaria durante el almacenamiento.

LPART= lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión.

LTA= agregometría de transmisión de luz simple (Light-transmission aggregometry).

MEA= agregometría por impedancia (Impedance aggregometry - multiple electrode aggregometry).

MRB= modificadores de la respuesta biológica.

MTX= metotrexato.

OMS= Organización Mundial de la Salud.

PAF= factor activador plaquetario.

PAS = solución aditiva de plaquetas.

PPI_24h = incremento plaquetario post-transfusional a las 24 horas.

PRP= plasma rico en plaquetas.

PPP= plasma pobre en plaquetas.

PS= fosfatidil serina.

RANTES= citoquina quimiotáctica.

RTA= reacción transfusional alérgica.

SAGM= sodio-adenina-glucosa-manitol.

TRAP= péptido activador del receptor de trombina.

TAPH = trasplante alógeno de progenitores hematopoyéticos.

UV= ultravioleta

VPM = volumen plaquetario medio.

Resumen

1. Resumen

Desde la primera transfusión directa realizada mediante una anastomosis entre vasos sanguíneos del receptor y del donante en 1914, los avances en el mundo de la medicina transfusional han sido numerosos e imprescindibles para el progreso de la medicina, como hoy la conocemos. A lo largo de las siguientes páginas realizaremos una breve revisión de la producción, almacenamiento y lesión asociada al almacenamiento de los concentrados de plaquetas, así como de la indicación transfusional y efectos adversos relacionados con la transfusión de éstos. También describiremos a continuación nuestra aportación a este campo.

En nuestro primer estudio hemos evaluado la calidad *in vitro* de los concentrados de plaquetas de buffy coat leucodepleccionados preparados por dos dispositivos automatizados OrbiSac o TACSI. A lo largo de un almacenamiento estándar, analizamos en los días 1, 5 y 7, las diferencias en el conteo celular, parámetros metabólicos, funcionalidad y activación plaquetaria, y moléculas proinflamatorias. Ambos productos plaquetarios cumplieron con los estándares de los productos plaquetarios en relación con el contenido de plaquetas y leucocitos. La evaluación *in vitro* del metabolismo plaquetario, funcionalidad, respuesta al choque osmótico o el estudio de agregación plaquetaria, fue similar entre ambos productos. Sin embargo, el sistema OrbiSac indujo un incremento transitorio en la activación de plaquetas y una mayor liberación de sustancias proinflamatorias (sCD62P, RANTES y sCD40L) en el día de la preparación de los concentrados de plaquetas.

En nuestro segundo estudio hemos comparado la eficacia transfusional de los concentrados de plaquetas, preparados por el método de plasma rico en plaquetas y los obtenidos con el método de buffy coat, en una cohorte de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. La transfusión de concentrados de plaquetas producidos por el método buffy coat se asoció con un mayor incremento del recuento plaquetario a las 24 horas, y supuso una menor exposición a donantes con cada transfusión. Identificamos como factores predictivos de un menor rendimiento transfusional, el diagnóstico

diferente al de leucemia aguda, la presencia de esplenomegalia, la profilaxis de enfermedad injerto contra huésped diferente de ciclosporina A y metotrexato, y la transfusión de concentrados de plaquetas producidos por el método de plasma rico en plaquetas. A pesar del mayor incremento en los recuentos plaquetarios en el grupo de pacientes transfundidos con concentrados de plaquetas buffy coat, no se objetivó una disminución de los eventos hemorrágicos.

Por último, en nuestro tercer estudio hemos implementado un protocolo simple y eficaz para el lavado de concentrados de plaquetas buffy coat con solución aditiva. La transfusión de concentrados de plaquetas lavados está indicada en pacientes muy específicos, como aquellos con reacciones transfusionales graves o con deficiencia de inmunoglobulina A o haptoglobina. Nuestro procedimiento supone la pérdida de alrededor del 15% del total de las plaquetas. *In vitro* se objetivó en estas plaquetas lavadas un discreto aumento de marcadores de activación (P-selectina) o la disminución de la reactividad plaquetaria medida con el test VerifyNow® cuando se utiliza un agonista poco potente como ADP. La reactividad plaquetaria medida por transmisión de luz simple o utilizando un agonista potente, como TRAP en el test de VerifyNow® no se afectó. La eficacia *in vivo* de estos concentrados de plaquetas lavados fue investigada en una cohorte de 11 pacientes onco-hematológicos seleccionados por la previsión de que necesitarían la transfusión de 2 concentrados de plaquetas en un breve intervalo de tiempo. La eficacia transfusional determinada por el incremento del recuento plaquetario corregido a la hora y 24 horas de la transfusión no mostró diferencias estadísticas significativas. Más relevante aún fue la observación de que la transfusión de estos concentrados de plaquetas lavados no se asoció con un incremento de episodios hemorrágicos.

1. Abstract

Since the first direct transfusion through an anastomosis between recipient and donor blood vessels in 1914, advances in the world of transfusional medicine have been extensive and essential for the progress of medicine as we know it today. Throughout the following pages we will briefly review the production, storage and lesion of platelets concentrates, as well as the indication and adverse effects related to platelets transfusion. We will also describe our contribution to this field below.

In our first study, we evaluated the *in vitro* quality of buffy coat leucodepleted platelet concentrates prepared by two automated OrbiSac or TACSI devices. Throughout a standard storage, differences in cell count, metabolic parameters, platelet function and activation, and proinflammatory molecules were analyzed on days 1, 5, and 7. Both platelet products met the standards in terms of platelet and leucocyte content. The *in vitro* evaluation of platelet metabolism, functionality, hypotonic shock response or platelet aggregation study, was similar between both products. However, the OrbiSac system induced a transient increase in platelet activation and a greater release of proinflammatory substances (sCD62P, RANTES and sCD40L) on the day of preparation of the platelet concentrates.

In our second study we compared the transfusion efficacy of platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma method and those obtained by the buffy coat method, in a cohort of patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Transfusion of platelet concentrates produced by the buffy coat method was associated with a greater 24 hours post-transfusion corrected count increment, and resulted in less donor exposure in each single transfusion. As independent predictors of poor platelets transfusion response, we identified the diagnosis other than acute leukemia, splenomegaly, prophylaxis of graft-versus-host disease other than cyclosporin A and methotrexate, and transfusion of platelet concentrates produced by the platelet-rich plasma method. Despite the largest increase in platelet counts, the

transfusion of buffy coat platelet concentrates provides no significant benefit regarding bleeding outcome.

Finally, in our third study we have implemented a simple and effective protocol for the washing of buffy coat platelet concentrate with additive solution. Transfusion of washed platelet concentrates is indicated in specific patients, such as those suffering from severe transfusion reactions or immunoglobulin A or haptoglobin deficiency. Our procedure resulted in the loss of about 15% of total platelets. *In vitro*, a minimal increase in activation markers (P-selectin) or a decrease in platelet reactivity measured with the VerifyNow® test when using a weak agonist such as ADP was observed in these washed platelets. Platelet reactivity measured by light transmission aggregometry or using a powerful agonist such as TRAP in the VerifyNow® test was not affected. The *in vivo* efficacy of the washed platelets concentrates was investigated in a cohort of 11 onco-haematological patients who were expected to receive at least two platelet transfusion in a short period of time. The transfusion efficacy as determined by the increase in the one hour and 24 hour platelet increment showed, no statistically significant difference. Remarkably, the transfusion of these washed platelets concentrates was not associated with an increase in bleeding episodes.

Prólogo

2. Prólogo

Las plaquetas o trombocitos son pequeñas pseudocélulas discoideas (0,5-3 μm) anucleadas procedentes de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos (80-150 μm). Una vez liberadas desde la médula ósea, las plaquetas pasan al torrente circulatorio, oscilando sus niveles normales entre 150-400x10⁹/L. A pesar de la falta de un núcleo, las plaquetas son metabólicamente activas con capacidad para sintetizar proteínas desde el ácido ribonucleico mensajero (ARNm).

La función principal de las plaquetas es activarse cuando pasan por un endotelio dañado para formar un tapón hemostático. Para ello, las plaquetas se unen y adhiere a la matriz subendotelial expuesta, reclutan otras plaquetas y células sanguíneas en el coágulo en desarrollo, liberan pequeñas moléculas y proteínas vasoactivas, y participan en el ensamblado y activación de las proteínas de la coagulación en un intervalo espaciotemporal finamente regulado. Recientemente, han sido identificadas otras funciones, como la de célula centinela inmunitaria ubicua o como regulador de la respuesta inflamatoria entre otras funciones [1,2].

Desde la descripción en 1910 por Duke de la relación inequívoca entre la presencia de trombocitopenia y el riesgo de sangrado, se han realizado múltiples estudios con el fin de disminuir el sangrado asociado a la trombopenia [3]. Es indiscutible que la disponibilidad de los concentrados de plaquetas (CPs), ha supuesto una de las aportaciones más significativas en la medicina moderna, y que la transfusión selectiva de estos componentes ha sido clave para lograr avances trascendentales, como el tratamiento de pacientes onco-hematológicos con quimioterapia y/o radioterapia, o los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas (TAPH) y de otros tejidos y órganos. Asistimos a un incremento de la demanda de CPs en todo el mundo, justificado por el envejecimiento de la población, el aumento de la incidencia, intensidad y duración del tratamiento, junto a la mayor supervivencia de los pacientes con neoplasias malignas onco-hematológicas [4].

A pesar del conocimiento obtenido en más de medio siglo, todavía existen en el campo de la obtención, conservación y uso clínico de CPs muchos aspectos controvertidos que precisan de una intensa actividad investigadora. Entre las cuestiones sometidas a continuo debate e investigación destacan: las indicaciones de la transfusión de plaquetas y los criterios de selección de pacientes; prevención y manejo de las reacciones transfusionales; los procedimientos de preparación de los CPs así como las condiciones del almacenamiento; los criterios de valoración de la eficacia clínica; y los controles de calidad aplicables para garantizar su seguridad y eficacia transfusional [5-7].

Introducción

3. Introducción

3.1 Utilización clínica de las transfusiones de plaquetas: Recomendaciones generales

3.1.1 Umbral de transfusión de plaquetas profilácticas

A lo largo del siglo XX, se realizaron diferentes estudios con el objetivo de establecer el umbral óptimo donde realizar transfusiones profilácticas basadas en el conteo plaquetario. Durante un largo periodo la práctica transfusional de plaquetas estándar fue la transfusión con un conteo de plaquetas por debajo de $20 \times 10^9/L$, en un intento de disminuir el sangrado. Esta práctica se sustentó en parte por los hallazgos de estudios no randomizados, como el de Gaydos y colaboradores [8]. En este estudio se objetivó que las hemorragias mayores (hematuria, hematemesis y melenas) ocurrían de forma más frecuentes con recuentos plaquetarios por debajo de $5 \times 10^9/L$ que cuando el recuento estaba entre $5 \times 10^9/L$ y $100 \times 10^9/L$.

El uso rutinario de transfusión de plaquetas desde la década de 1970, en pacientes con enfermedades hematológicas disminuyó la mortalidad secundaria a eventos hemorrágicos (menos de un 1%) [9]. Sin embargo, el uso generalizado del umbral de $20 \times 10^9/L$ implicó que las necesidades de plaquetas aumentaran un 15% entre 1994 y 1997 en los Estados Unidos de América. [10].

Este incremento del uso de plaquetas provocó nuevos estudios para determinar si el umbral considerado seguro, podía ser disminuido a $10 \times 10^9/L$ [11]. Rebullá y colaboradores demostraron en pacientes diagnosticados de leucemia aguda mieloide que el dintel transfusional de $10 \times 10^9/L$, disminuía en un 21,5% el uso de plaquetas sin incrementos en los concentrados de hematíes transfundidos ni el porcentaje de sangrados mayores. No obstante sí se incrementaba de forma significativa los días de sangrado de 2 a 3 al disminuir el umbral. En línea con estos resultados, Heckman y colaboradores observaron en un estudio aleatorizado en un centro, que en pacientes diagnosticados de leucemia mieloide aguda, la disminución del umbral podía disminuir la utilización de plaquetas a expensas de un leve incremento en el número de sangrados [12]. Por el contrario, Zumberg y

colaboradores en un estudio aleatorizado en pacientes sometidos a TAPH incluyendo tanto a pacientes pediátricos como adultos, no observaron diferencias en la incidencia de sangrado o gravedad, sin alcanzar una reducción el uso de concentrados de plaquetas [13]. Esta diferencia se explicaba por un mayor uso de anfotericina B y un uso desproporcionado de transfusiones de plaquetas en el grupo con un dintel de $10 \times 10^9/L$. El consenso formulado a partir de estos ensayos fue que los pacientes con trombopenia hipoproliferativa debida a neoplasias malignas hematológicas, quimioterapia citotóxica y trasplantes de células hematopoyéticas deben recibir una transfusión de plaquetas cuando el recuento plaquetario es inferior a $10 \times 10^9/L$. En caso de que haya otros factores de riesgo de hemorragia, como sepsis, uso concurrente de antibióticos u otras anomalías de la hemostasia, el umbral transfusional se incrementa a cifras superiores ($20 \times 10^9/L$ o $30 \times 10^9/L$) [14–16]. En un metaanálisis reciente, se ha confirmado que el umbral de $10 \times 10^9/L$ parece ser tan efectivo como otros umbrales superiores ($20 \times 10^9/L$ o $30 \times 10^9/L$) para prevenir el sangrado clínicamente significativo, medido como número de pacientes con un episodio de hemorragia clínicamente significativo (grado 2 o superior de la Organización Mundial de la Salud (OMS)), número de días con sangrado clínicamente significativo (ajustado para eventos repetidos), número de pacientes con hemorragias graves o potencialmente mortales y tiempo hasta el primer episodio de sangrado clínicamente significativo [17].

3.1.2 Dosis óptima de transfusión de plaquetas profilácticas

La dosis del producto plaquetario transfundido se basa en la necesidad de elevar el recuento de plaquetas del paciente por encima de cierto umbral establecido como seguro. A lo largo de los años, nuestra comprensión de la hemorragia en pacientes trombocitopénicos ha avanzado y la evidencia actual sugiere que la necesidad diaria de plaquetas es de alrededor de 7100 plaquetas/ μl para mantener la hemostasia [18]. Las plaquetas y las células endoteliales participan conjuntamente en numerosas funciones fisiológicas a través de

complejas señales bioquímicas. Los estudios en animales han demostrado que la trombocitopenia se asocia con el adelgazamiento gradual del endotelio de la pared del vaso con el tiempo y que, si persiste la trombocitopenia, se producen gradualmente lagunas entre las células endoteliales adyacentes por la separación del complejo multimolecular de las caderinas [19]. Este adelgazamiento y fenestración del endotelio se acompaña con el uso continuo y creciente de plaquetas circulantes para evitar la extravasación venosa postcapilar de hematíes a través de estos espacios.

Un modelo matemático predijo que dosis más pequeñas y más frecuentes de plaquetas serían tan efectivas como dosis más altas de plaquetas para mantener el recuento de plaquetas de los pacientes por encima de un umbral establecido [20]. Esta hipótesis se analizó en el estudio de Tinnouth, en el que se comparó si la estrategia de transfundir dosis bajas de plaquetas (3 unidades) frente a una dosis estándar (5 unidades) era más eficaz, dando como resultado una reducción del 25% en el número de plaquetas transfundidas [21]. Posteriormente ha habido dos ensayos que han analizado esta estrategia, un ensayo que fue detenido de forma precoz debido a un exceso de sangrado de grado 4 de la OMS [22], y el ensayo clínico PLAtelet DOse (PLADO) [23] que confirmó el hallazgo anterior de Tinnouth, de que el uso de baja dosis en la transfusión profiláctica reducía el número de plaquetas totales utilizadas (53% respecto al grupos de dosis alta y un 18% respecto al grupo de dosis intermedias), a expensas de un mayor número de transfusiones (5 en el grupo de baja dosis respecto a 3 en el grupo de dosis intermedia y alta), pero sin incrementar el riesgo de sangrado grado ≥ 2 de la OMS.

3.1.3 Transfusiones de plaquetas profilácticas frente a sólo terapéuticas

Una revisión retrospectiva de casi 3000 pacientes trombocitopénicos adultos durante un período de 10 años no mostró ninguna relación entre el

recuento plaquetario de la primera mañana o el recuento plaquetario más bajo del día y el riesgo de sangrado grave o potencialmente mortal (grado 3 o 4 de la OMS) [24]. En línea con esta hipótesis, un estudio observacional prospectivo de 197 pacientes con trombopenia secundaria a tratamiento quimioterápico ha confirmado que el recuento plaquetario predice la necesidad de una nueva transfusión de plaquetas profilácticas pero no el riesgo de sangrado [25].

Otro estudio en línea con los anteriores, demostró la ausencia de relación entre la gravedad de la trombocitopenia y el riesgo de sufrir un episodio de hemorragia intracraneal grave. La revisión de los informes de estos casos obtenidos de ensayos clínicos no evidenció de forma clara que hubiera una asociación entre la aparición de hemorragia intracraneal mayor y el recuento plaquetario absoluto justo antes de la aparición de un sangrado grave [26]. Por lo tanto, el beneficio global de una política profiláctica de transfusión de plaquetas frente al uso de plaquetas sólo de forma terapéutica, usando el umbral del recuento de plaquetas no se ha establecido. Además estos datos plantean la cuestión de si el enfoque de transfusiones profilácticas de plaquetas definido por el umbral es adecuado.

Esta hipótesis se evaluó en el estudio de Wandt donde se comparó el resultado de transfundir plaquetas terapéuticas después del trasplante autólogo con un control histórico. Durante el estudio, sólo el 19% de los pacientes tuvieron una hemorragia clínicamente relevante de grado leve o moderado, y no se documentó ninguna hemorragia grave o potencialmente mortal, siendo esta tasa comparable al control histórico (20%). Con esta estrategia, un tercio de todos los trasplantes, y 47% de los que recibieron altas dosis de melfalán, no precisaron transfusión de plaquetas, lo que disminuyó el número de transfusiones de plaquetas en un 50% en comparación con su control histórico [27]. Posteriormente esta estrategia ha sido valorada en dos ensayos clínicos. En el ensayo aleatorio de Wandt y colaboradores, el objetivo principal fue la evaluación del número de plaquetas transfundidas, objetivándose una reducción de transfusiones de plaquetas en un 33,5% en el grupo de transfusiones

terapéuticas. Sin embargo, la incidencia de sangrado clínicamente relevante fue significativamente mayor (28,7% vs 9,5%), aunque esto no es sorprendente ya que este fue el desencadenante de la transfusión en el brazo experimental [28]. El ensayo controlado TOPPs comparó la misma estrategia que el ensayo clínico anterior, aunque el objetivo principal fue el porcentaje de sangrado ≥ 2 de la OMS. En este estudio se objetivó un sangrado grado ≥ 2 de la OMS del 50% vs, 43% ($p=0.04$, análisis de superioridad). El grupo que no recibía plaquetas profilácticas estuvo más días con sangrado, tuvo un menor intervalo desde la primera transfusión a un sangrado ≥ 2 menor, pero recibió menos transfusiones de plaquetas por paciente [29]. Al igual que el anterior estudio, señalan como un grupo de bajo riesgo de sangrado los pacientes sometidos a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. Estos resultados han ampliado el debate, sugiriendo que la estrategia de transfusión de plaquetas terapéuticas podría convertirse en un nuevo estándar de atención en pacientes seleccionados de forma segura y factible en centros seleccionados.

3.1.4 El sangrado como objetivo principal en los ensayos clínicos

En la última década, los ensayos clínicos han evaluado como objetivo principal la aparición de un sangrado grado ≥ 2 de la OMS, en vez del rendimiento transfusional. Como hemos comentado en el apartado anterior, este cambio en los estudios actuales se debe a que no existe una clara correlación entre el rendimiento transfusional y la aparición de eventos hemorrágicos.

Uno de los principales inconvenientes del uso de este parámetro, ha sido la amplia variabilidad tanto del porcentaje de eventos hemorrágicos descritos (5-70%) [11,21,23,28,29] como de los tipos de sangrado documentados. Esta disparidad se debe a la forma de documentar los signos y síntomas de sangrado y como se ha traducido esta información a una puntuación o grado clínicamente significativo. Así, existen diferencias en los resultados descritos por la forma en que se han identificado, registrado y clasificado los sangrados. Aunque el sistema

de clasificación de la OMS fue ampliamente utilizado para calificar el sangrado, no hay consistencia en las definiciones de grado de sangrado entre los diferentes estudios. Una de los métodos propuestos para mejorar la reproducibilidad de estos estudios es la creación de formularios estandarizados que sean usados por los investigadores para registrar signos y síntomas de sangrado, así como las intervenciones para tratar el sangrado y una escala de clasificación que sea clínicamente relevante y pueda aplicarse de forma reproducible [30]. La resolución de estas disparidades es imprescindible para aportar solidez a los resultados documentados en los ensayos, y realizar comparaciones válidas entre los estudios.

El establecimiento de una actitud transfusional eficiente es de interés general dado que en la última década, se observa en diferentes estudios en países desarrollados un aumento generalizado del uso de plaquetas que oscila entre un 17%-72%. Este incremento se debe fundamentalmente al incremento y envejecimiento de la población, y al aumento de la incidencia y prevalencia de las enfermedades hematológicas, así como un cambio en el manejo de estas (aumento de TAPH) [4]. El incremento del uso de productos plaquetarios junto con el progresivo envejecimiento de la población, hacen necesarias políticas sanitarias nacionales para la reducción del uso inapropiado de componentes sanguíneos, así como fomentar estudios que estratifiquen el riesgo hemorrágico de los pacientes de forma individualizada con vista a mantener un suministro adecuado de productos sanguíneos.

3.2 Reacción transfusional

Actualmente se considera la transfusión de componentes sanguíneos como un procedimiento muy seguro, aunque no está exento de producir efectos adversos, llamados reacciones transfusionales. La gravedad de las reacciones transfusionales abarca un amplio espectro clínico desde las leves que son la mayoría, a otras que en algunos casos pueden llegar a poner en riesgo la vida del paciente. Las reacciones transfusionales son clasificadas según la etiología como de origen inmunológico, infeccioso, químico y físico, y, a su vez según la cronología de su aparición, en complicaciones agudas o retardadas.

Las reacciones transfusionales “clásicas” son las denominadas inmunológicas, causadas por la interacción de anticuerpos adquiridos o “heredados” con antígenos extraños procedentes de los componentes celulares o humorales de los productos sanguíneos transfundidos. Dentro de las reacciones transfusionales inmunológicas agudas, estas se dividen según la clínica en reacción febril no hemolítica, reacción alérgica, reacción hemolítica aguda, lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (LPART) y aloinmunización con destrucción plaquetar inmediata. Dentro de las retardadas se encuentran la reacción hemolítica retardada, aloinmunización frente antígenos eritrocitarios, púrpura postransfusional y enfermedad injerto contra huésped postransfusional [31].

La frecuencia de las reacciones transfusionales inmunológicas varía desde algunas bastante frecuentes, como la reacción alérgica o la reacción febril no hemolítica, a otras infrecuentes como la anafilaxia o la reacción hemolítica intravascular secundaria a la incompatibilidad ABO. La reacción transfusional alérgica (RTA) es la reacción adversa más frecuente en la transfusión de los componentes sanguíneos, con una incidencia que varía del 0,15% para el plasma y concentrados de hematíes hasta un 5% para la transfusión de plaquetas, aunque el riesgo de desarrollar una reacción después de una transfusión es desconocido. El espectro de gravedad de las RTA es muy amplio, aunque la mayoría suelen ser leves, con aparición de prurito localizado y/o urticaria aislada. Menos del 10% de

las RTA son graves, con aparición de episodios de angioedema, broncoespasmo y/o hipotensión, desembocando en anafilaxia [32].

3.2.1 Reacción transfusional alérgica

3.2.1.1 Mecanismos

A pesar de los avances realizados en la última década, la fisiopatología de las reacciones transfusionales sigue sin estar aclarada. Los mediadores más importantes en la RTA son el déficit de proteínas plasmáticas como la inmunoglobulina A (IgA) o la haptoglobina (Hp), alérgenos alimentarios, citoquinas y quimiocinas inflamatorias, que se acumulan en los productos sanguíneos durante el almacenaje. Además de características específicas de los receptores, como en el caso de los pacientes con déficit de IgA, que son especialmente propensos a sufrir una reacción anafiláctica después de una transfusión sanguínea si tiene anticuerpos anti-IgA.

3.2.1.1.1 Mecanismo dependiente de alérgenos

Las proteínas plasmáticas como alérgeno

La mayoría de los alérgenos causantes de una reacción alérgica no han sido descritos. En algunos casos, se han descrito algunos déficits de proteínas plasmáticas, como causantes de reacciones anafiláticas como la IgA, la Hp y el complemento C4, tanto por la falta del antígeno infundido como la expresión de otra versión alélica en el receptor. Cabe destacar la existencia de diferencias raciales en la prevalencia de deficiencia de IgA y Hp, lo que justifica la diferencia en la incidencia de episodios anafiláticos mediada por estos anticuerpos dependiendo de la raza. La frecuencia del alelo delecionado de Hp en las poblaciones del este y sudeste de Asia es del 1,5-3%. Por lo tanto, la prevalencia de esta deficiencia es de 1/1000 a 1/4000 personas. Sin embargo, este alelo no se ha detectado en las poblaciones africana, occidental y del sur de Asia o europea. En cambio, la prevalencia de deficiencia de IgA en la población

japonesa es de aproximadamente un 1/30000, inferior a la descrita en europeos (1/250). Por lo tanto, la deficiencia de Hp y los anticuerpos de Hp deben ser considerados en la población asiática oriental, mientras que la deficiencia de IgA y los anticuerpos IgA debe ser tenida en cuenta en la población europea, respectivamente, como una posible causa de reacciones anafilácticas relacionadas con la transfusión [7].

Aunque hay muchos casos descritos de reacciones anafilácticas, muchas de ellas graves, en la actualidad se desconoce la incidencia real de reacciones transfusionales causadas por el déficit de IgA y Hp. En un estudio retrospectivo, Anani y colaboradores estimaron que el riesgo de tener una reacción transfusional grave en pacientes con déficit de IgA es del 10% mientras que en la población general es del 0,052% [33]. Aunque muchos autores han descrito casos de reacciones anafilácticas secundarias al déficit de IgA, estas son escasas y las pruebas necesarias para demostrar la presencia de anti-IgA son muy especializadas lo que dificulta el estudio y validación de esta entidad. Por este motivo, Sanders y otros autores han puesto en entredicho la reacción transfusional anafiláctica relacionada con la IgA, dado que no la consideran basada en una evidencia científica. Los argumentos de estos autores se basan en las siguientes afirmaciones [34]:

- 1) los autores refieren los resultados de 359 transfusiones con reacciones anafilácticas con una sospecha de ser ocasionadas por déficit de IgA. En este estudio, el análisis del suero de los paciente demostró que sólo en 61 pacientes (17%) tenían un déficit de IgA además de la presencia de anti-IgA;
- 2) diferentes casos de pacientes diagnosticados de déficit de IgA con anti-IgA han recibido diferentes productos sanguíneos sin sufrir reacciones transfusionales;
- 3) en dos casos descritos ninguno de los pacientes tuvo una secuencia esperada de sensibilización con una transfusión, y una posterior

reacción transfusional, sino que tuvo una reacción transfusional con una primera transfusión, y posteriormente no tuvo nuevos episodios tras recibir diferentes compuestos sanguíneos;

- 4) los autores indican que si la frecuencia de déficit de IgA y anti-IgA en los pacientes es igual a la de los donantes, en Estados Unidos de América deberían producirse 48 reacciones anafilácticas diarias, por lo que consideran que la presencia de anti-IgA no es necesaria ni suficiente para provocar una reacción transfusional anafiláctica.

Alérgenos químicos

Aparte de las proteínas plasmáticas, el agente químico azul de metileno, usado para la inactivación viral en el plasma fresco congelado, se ha descrito como causante de un shock anafiláctico tras la transfusión de plasma. Aunque el riesgo real parece ser extremadamente bajo, por el amplio uso de este componente y las pocas reacciones descritas, se deben tomar precauciones en los lugares donde se empleen sistemas de inactivación con azul de metileno [35].

Alérgenos alimentarios

En la actualidad, se han descrito dos casos de una reacción transfusional anafiláctica y una reacción urticarial leve secundaria a la transferencia pasiva de un alérgeno de cacahuete y de camarón a través de la transfusión de un componente sanguíneo. En el primer caso, tras la reacción transfusional, en el estudio de posibles agentes causantes se descartó la presencia de déficit de IgA, Hp y C4, así como el de alergias a fármacos, látex o la presencia de anticuerpos frente a antígenos leucocitarios humanos (HLA), y en el suero del paciente alérgico a los cacahuetes se detectó la presencia de anticuerpos inmunoglobulina E (IgE) contra el alérgeno mayor del cacahuete Ara h2. En el segundo caso, los autores descartaron la presencia de déficit de IgA, y observaron una triplicación de los niveles de IgE, junto a un aumento de los niveles de IgE específica frente a camarón en el suero postransfusional respecto al pretransfusional. En ambos casos los autores hipotetizaron como posible causa de la reacción transfusional la

transferencia pasiva de alérgenos, aunque el estudio de antígenos de alérgenos implicados en los productos sanguíneos no fue realizado [36,37].

Vías moleculares

Los anticuerpos tipo inmunoglobulina G (IgG) generalmente se detectan tanto en las reacciones anafilácticas en pacientes con déficit de IgA, Hp, como contra sustancias utilizadas en el ámbito médico, como protamina, dextrano o sustancias recombinantes de tipo IgG, como el factor de necrosis tumoral α [7,38]. Aunque la vía IgE se considera responsable de reacciones alérgicas, no es exclusivamente así. Los anticuerpos de IgG pueden inducir síntomas alérgicos o anafilácticos. El mecanismo plausible se debe a que la fijación de complemento a IgG media la liberación de anafilotoxinas C3a y C5a, que actúan directamente sobre células diana o promoviendo la liberación de compuestos vasoactivos desde el mastocito [39].

Por tanto, mecanismos mediados tanto por IgG como IgE pueden ser causantes de reacciones anafilácticas. En caso de anafilaxia, es recomendable medir anticuerpos IgG, y si es posible, clases de IgE. Aunque la inmunoglobulina IgE, Fc ϵ R, los mastocitos y la histamina se consideran que desempeñan un rol principal en la anafilaxia, otra vía mediada por IgG ha sido demostrada recientemente en un modelo murino, que implicaba Fc γ Rs, basófilos y factor activador plaquetario (PAF) como mediadores principales. En este modelo, PAF en vez de histamina, era la responsable química de provocar la reacción anafiláctica [40]. Vadas y colaboradores investigaron el papel de PAF y PAF acetilhidrolasa, la enzima que inactiva PAF, en reacciones anafilácticas en humanos. Los autores concluyeron que un fallo en la enzima PAF acetilhidrolasa para inactivar a PAF contribuía a la gravedad de la anafilaxia en base a las siguientes observaciones [41]:

- 1) los niveles séricos de PAF estuvieron directamente correlacionados con la gravedad de la anafilaxia;

- 2) la actividad sérica de PAF acetilhidrolasa estuvo inversamente correlacionada con la gravedad de la anafilaxia;
- 3) la actividad de PAF acetilhidrolasa estuvo disminuida de forma significativa en pacientes con reacciones anafilácticas mortales con cacahuets respecto a los controles.

Con estos hallazgos, los autores sugieren que la deficiencia de PAF acetilhidrolasa es un factor independiente para sufrir una reacción anafiláctica mortal. Sin embargo, la deficiencia de PAF acetilhidrolasa sola no es suficiente para predisponer a una reacción anafiláctica mortal; otros factores como la sensibilización a un alérgeno, la edad o la presencia o ausencia de asma son importantes para el desenlace final.

Además de los basófilos, los neutrófilos y monocitos han sido descritos con un papel crítico en el inicio de la anafilaxis en un sistema murino. En esta vía, FcγRs, IgG y PAF están involucradas. Sin embargo, el papel exacto, la clase de anticuerpos y los mediadores químicos en el sistema humano no se han descrito. [7].

3.2.1.1.2 Vía independiente de alérgenos

Otra posible causa de reacciones, son los modificadores de la respuesta biológica (MRB), tales como las citoquinas inflamatorias y quimiocinas, que se acumulan en los componentes sanguíneos durante su almacenamiento, y son infundidas con la transfusión de los componentes sanguíneos. Durante el almacenamiento de las plaquetas, se detecta un incremento progresivo de sustancias MRB, como el factor de crecimiento endotelial, el ligando CD40 soluble, la histamina, factor de crecimiento transformador B1 y RANTES (citoquina quimiotáctica, también conocida como CCL5) [42]. Existen argumentos para creer que estas moléculas se infunden en lo que pueden ser dosis clínicamente significativas y posiblemente alterar las funciones inmunes de los leucocitos y células endoteliales en el receptor de la transfusión. Aunque las funciones de estos MRB en la aparición de reacciones alérgicas permanecen en

gran parte desconocidas, es posible que estas u otras sustancias induzcan o modulen las reacciones alérgicas [32].

3.2.1.1.3 Factores del paciente diferentes a alérgenos y anticuerpos

Los individuos alérgicos tienden a tener múltiples manifestaciones alérgicas, por lo que es razonable sospechar que una predisposición atópica es un factor de riesgo para sufrir una RTA. En 1941, Maunsell y colaboradores encontraron experimentalmente que una historia atópica a alérgenos ambientales se asocia con un mayor riesgo de sufrir una RTA, y que la administración repetida de transfusiones desensibilizó a 10 de 11 pacientes con reacciones urticariales [43]. Posteriormente otros estudios, han observado que la mediana de IgE total, una medida cruda de la predisposición atópica, fue 6,7 veces mayor en los sujetos que experimentaron una RTA en comparación con los controles que nunca tuvieron RTA, y que los niveles de IgE específica de los alérgenos ambientales comunes fue un 58% superior a la de los controles [44]. Otros datos que corroboraron que una predisposición del receptor se asocia a RTA y no sólo una característica intrínseca del producto aumenta la susceptibilidad a padecer RTA, es la falta de concordancia de RTA en dos receptores diferentes de las mismas colecciones de plaquetas de aféresis [45]. Estas observaciones clínicas son corroboradas por datos *in vitro*, previamente comentados en el apartado de factores del paciente diferentes a alérgenos y anticuerpos, que muestran que el umbral y la magnitud de la liberación de histamina de los mastocitos y basófilos varían entre los individuos y que los receptores de transfusión que experimentan RTA tienen factores plasmáticos que aumentan la susceptibilidad de los mastocitos [46]. No parece plausible que la IgE específica a los alérgenos ambientales cause una RTA *per se*, pero sí que la predisposición atópica general del paciente aumenta la susceptibilidad a padecer una RTA. Como hemos comentado previamente, se puede adquirir una predisposición atópica [47], como en el caso de la transferencia pasiva de IgE específica de cacahuete [48]. A día de hoy, no se ha demostrado una predisposición genética, como en las enfermedades alérgicas.

Existen pruebas limitadas de que algunos donantes están asociados más frecuentemente con RTA que la población general de donantes [45]. Sin embargo, no existen estimaciones de la frecuencia de donantes sospechosos en una gran población de donantes. La enfermedad atópica en los donantes no parece conferir un riesgo de RTA, aunque la atopia es frecuente en las poblaciones de donantes [47]. Sin embargo, sí se confirma que los componentes de algunos donantes están particularmente asociados con RTA independientemente del receptor. Aunque se desconoce hasta qué punto el riesgo aumentado es intrínseco al donante, como se ha publicado en algún caso [49,50], o se debe a una susceptibilidad que se desenmascara durante el procesamiento y almacenamiento del componente.

3.2.1.1.4 Transferencia pasiva de anticuerpos y sensibilización pasiva

Transferencia pasiva de anticuerpos

En un estudio de 73.569 donantes, Vyas y colaboradores registraron 113 donantes con deficiencia de IgA, 30 con bajos niveles y 83 con niveles no detectables. De estos, 13 tenían anticuerpos IgA clase-específicos o de alto título, y sólo dos de estos 13 donantes tenían antecedente de una administración de un componente sanguíneo o gammaglobulina. Sin embargo, no hubo ninguna reacción adversa notificada [51]. En otro estudio, Winters y colaboradores revisaron 25 transfusiones de aféresis de 4 pacientes donantes con déficit de IgA con anticuerpos IgA y no se observaron reacciones alérgicas [52]. Por lo tanto, la transfusión de anticuerpos IgA puede no provocar reacciones transfusionales. A día de hoy, no se han publicado artículos de los efectos de la transferencia pasiva de anticuerpos Hp. Recientemente, se han publicado tres estudios de RTA, donde se identificó en el plasma de un donante la presencia de una IgE dimérica o trimérica, una IgG anti-IgE humana y un anticuerpos CD36 (Nak) [49,50,53].

Sensibilización pasiva

Cuando anticuerpos IgE dirigidos contra ciertos alérgenos, usualmente alimentos, alérgenos inhalados o fármacos, son infundidos en un paciente como

parte de una transfusión, los mastocitos y basófilos puede capturar estos anticuerpos IgE infundidos a través del receptor FcεRs expresados en la superficie celular. Esto es conocido como sensibilización pasiva. Posteriormente a la sensibilización, una reacción alérgica puede ocurrir después de la ingesta o inhalación de estos alérgenos. Un estudio en población sueca y noruega encontró que el 23% de los donantes tenían unos niveles significativos de anticuerpos IgE a alérgenos comunes, y de estos entre un 6,8 y un 16,7% tenían niveles extremadamente elevados. La mayoría de los donantes estaban sensibilizados a los pólenes, piel de animales y ácaros, pero varios tuvieron niveles elevados de anticuerpos IgE contra penicilina G, látex y cacahuete [47]. Por lo tanto, el riesgo de una sensibilización pasiva por transfusión de componentes sanguíneos no es probablemente bajo.

El mismo grupo de investigadores realizó posteriormente un estudio *in vivo* en el que se seleccionaron y transfundieron dos unidades (cada una de aproximadamente 300 ml) que contenían concentraciones de anticuerpos IgE conocidas contra el polen de la gramínea (8-205 kilo unidades de antígeno (kU_A/l) [54]. Las IgE procedentes de la donación en el plasma del receptor fueron detectadas 3 horas después de la transfusión, y se mantuvieron en el torrente sanguíneo una vida media de 1,13 días. El test de sensibilización de los basófilos fue positivo en la muestra a las 3 horas de la infusión, con un rápido aumento hasta alcanzar el pico máximo a los 3-4 días, tras la que se observó un descenso de días a semanas. El pico máximo y la duración de la actividad del test de los basófilos se correlacionaron con la cantidad de inmunoglobulinas transfundidas. Esto nos sugiere que los anticuerpos IgE contra ciertos alérgenos pueden sensibilizar a los basófilos del paciente.

En la literatura encontramos casos de sensibilización pasiva descritos, como el de Branch y Gifford [55], que describieron un episodio de urticaria generalizada en un receptor que había recibido cefalotina 2 días después de una transfusión de sangre total de 4 donantes. Uno de estos donantes era alérgico a cefalotina y había desarrollado anticuerpos contra este antibiótico. En el estudio

de anticuerpos contra-cefalotina se identificó en la sangre del receptor de la transfusión, pero no antes de la transfusión. En otro estudio, Arnold y colaboradores describieron un único caso de transferencia pasiva de alergia a los frutos secos después de la transfusión de plasma fresco congelado [48].

3.2.2 Prevención

Uno de los grandes problemas de las reacciones transfusionales se debe a que no se puede distinguir los síntomas de las reacciones leves de los primeros síntomas de otras reacciones de consecuencias más graves, como una reacción anafiláctica, un cuadro séptico o una reacción hemolítica intravascular. Por lo tanto, ante el inicio de síntomas compatibles o sospechosos con una reacción transfusional se debe parar la infusión, y excepto para las reacciones alérgicas más leves, indicar su finalización.

El tratamiento más frecuente empleado para la prevención de la reacción alérgica, y recomendado por Manual técnico de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) para reacciones alérgicas frecuentes, es la premedicación con antihistamínicos, siendo el fármaco más empleado la dexclorfeniramina maleato (Polaramine®) 15 minutos antes de la transfusión [56]. El uso de la medicación pretransfusional se debe a que en los años 50, hasta en un 25% de las transfusiones sucedían reacciones transfusionales. En esta época, se hipotetizaba que la mayoría de las reacciones transfusionales ocurrían por un aumento de histamina en los componentes sanguíneos. Por este motivo, se postuló el uso de medicación que bloqueara la liberación de histamina para prevenir las reacciones transfusionales [57]. Durante las dos últimas décadas, diferentes estudios en los que se ha evaluado la implementación de un protocolo de uso de premedicación pretransfusional [58-60], han observado que el uso de premedicación no disminuía las reacciones febriles no hemolíticas ni las alérgicas ni en la población adulta [58,59], ni en la pediátrica [60], Sí se ha objetivado que los pacientes con un episodio de reacción transfusional, tienen un mayor riesgo

de experimentar una segunda reacción transfusional [59]. En esta línea, el ensayo clínico realizado por Kennedy y colaboradores con productos sanguíneos leucoreducidos postalmacenamiento, objetivaron que el uso de medicación pretransfusional no reduciría el riesgo global de tener una reacción transfusional, aunque sí podría reducir el riesgo de presentar una reacción febril no hemolítica en un 52%. Estos autores determinaron que hacía falta premedicar 344 transfusiones para prevenir una reacción transfusional, o si la media de transfusión por paciente era de 13 transfusiones, aproximadamente 26 pacientes deben ser tratados para prevenir una reacción transfusional [61]. Un metaanálisis de los diferentes estudios de uso de premedicación pretransfusional ha concluido que el uso de ésta es ineficaz para prevenir reacciones, independientemente del historial de reacción transfusional alérgica y febril no hemolítica y de si fueron o no transfundidos con productos sanguíneos leucodepleccionados [62].

Uno de los cambios más significativos, ha sido el aumento de la manipulación de productos sanguíneos, tendiendo en la actualidad hacia una terapia de componentes. La leucodeplección previa al almacenamiento ha demostrado una reducción de la frecuencia de las reacciones adversas, especialmente las reacciones transfusionales febriles no hemolíticas, debido a la reducción de las sustancias MRB durante este período [63,64]. Sin embargo, esta estrategia no es completamente efectiva. Por este motivo, el desarrollo de reacciones transfusiones recurrentes, incluso leves, en pacientes con requerimientos transfusionales crónicos implica el suministro por parte de los Bancos de Sangre de productos sanguíneos modificados, como productos con menor volumen, resuspendidos en suero fisiológico o lavados, como medida preventiva. El uso de componentes con depleción de plasma frente a la leucoreducción postalmacenamiento disminuye de forma significativa un 34% de las reacciones transfusionales, además de la gravedad de las reacciones [65]. En el análisis multivariante de este estudio, se identificó a la interleucina 6 como el factor clave que incrementa el riesgo de reacción. Otro factor que se asoció con un incremento del riesgo de tener una reacción transfusional fue el sexo femenino, y en concreto en las pacientes con antecedente de embarazo. [65]. Este

mismo grupo comparó en un ensayo clínico randomizado los efectos de la depleción de plasma frente a la leuco-reducción prealmacenamiento, objetivando que existía una reducción absoluta de 9% de las reacciones transfusionales a favor de los componentes leuco-reducidos prealmacenamiento sin ser esta diferencia estadísticamente significativa por la baja potencia del estudio [64]. Posteriormente, Azuma y colaboradores demostraron que tanto la resuspensión como el lavado de plaquetas con la solución aditiva M-sol, con una reducción de la cantidad de plasma por debajo del 10%, reducía significativamente las reacciones transfusionales, consiguiendo adecuados rendimientos transfusionales [66]. En esta línea, Tobian y colaboradores, en un estudio retrospectivo, observaron que la incidencia de reacciones transfusionales en aféresis plaquetarias era de 5,5%. Esta incidencia disminuía hasta un 1,7% cuando se administraban aféresis con reducción de plasma y hasta un 0,5% cuando el producto era lavado. En este estudio se estimó que el número de transfusiones de aféresis hasta la primera reacción alérgica era de 6, y aumenta hasta 13 si se administraba productos reducidos y 40 si son lavados [67].

3.3 Tipos de concentrados de plaquetas

En la actualidad, los centros transfusionales y/o bancos de sangre obtienen los CPs de donaciones selectivas de plaquetas por aféresis, o del fraccionamiento de unidades de sangre total, por el método de plasma rico en plaquetas (PRP) o de buffy coat (BC), como se ve en la figura 1.

3.3.1 Preparación de CPs de aféresis de donante único

La palabra aféresis deriva de la palabra griega *aphairesis*, y significa retirar o eliminar. Las plaquetas de aféresis se obtienen de un donante único

separando y retirando las plaquetas de los otros componentes sanguíneos con separadores celulares automáticos [68].

Para la obtención de plaquetas de aféresis se requiere una inserción venosa (entrada/salida a través del mismo catéter) o dos inserciones venosas (entrada y salida a través de distintos catéteres) según el dispositivo. A través de la inserción se extrae la sangre total del donante mediante una máquina de aféresis, se anticoagula con una solución de citrato (ácido cítrico dextrosa), se separan las plaquetas en una bolsa de plástico con adecuada permeabilidad gaseosa y se devuelve el resto de la sangre al donante. Este procedimiento dura 1.5-2 h, y se obtiene una o dos unidades transfusionales de plaquetas con un volumen final de 100-400 mL, con una mínima pérdida de hematíes y plasma para el donante. Una vez obtenidas, las plaquetas se almacenan en condiciones estándar de banco de sangre, y habitualmente resuspendidas en una mezcla de plasma (20-35%) y solución aditiva de plaquetas (PAS) (65-80%).

Actualmente, existen en el mercado varios equipos de aféresis que varían en relación con las inserciones venosas en el donante, sistema de colecta de las plaquetas, volumen de plasma del producto final o contenido de leucocitos residuales. En algunos de estos equipos las plaquetas permanecen en la cámara de centrifugación durante todo el ciclo de aféresis, siendo recolectadas al final del proceso. En otros por el contrario, las plaquetas son recogidas de forma continuada durante la aféresis. Algunos equipos proporcionan directamente productos leucorreducidos de acuerdo con los estándares actuales. En distintos estudios recientes se ha evaluado el impacto que tienen las diferencias técnicas de los procesadores, sobre el rendimiento de recuperación de plaquetas, sobre parámetros plaquetarios como el grado de activación y sobre los eventos adversos en los donantes mostrando diferencias entre los diferentes modelos [69–73].

En comparación con los CPs estándar de sangre total, las plaquetoaféresis que se obtienen rutinariamente contienen un número de plaquetas entre 4 y 8 veces superior, y se emplean como dosis transfusional. No obstante, con algunos

procesadores es posible la obtención de plaquetoaféresis dobles o triples, equivalentes a dos o tres dosis transfusionales, aunque esta opción también depende de parámetros del donante. La aféresis de plaquetas de donante único es el procedimiento ideal para la obtención de plaquetas HLA compatibles en pacientes con refractariedad transfusional, o de plaquetas con un determinado genotipo de HPA (antígeno plaquetario humano) para neonatos afectos de trombopenia aloinmune neonatal causada por anticuerpos maternos anti-HPA.

Una de las ventajas más importantes de las unidades de aféresis respecto a los CPs de sangre total, es la disminución del riesgo de transmisión de enfermedades por la menor exposición a diferentes donantes con cada transfusión [74]. Aunque éste ha disminuido por el cribado de infecciones y los criterios de selección de donantes más estrictos, no existe un riesgo cero en la medicina transfusional. La situación más temida es la transmisión de patógenos emergentes con un período ventana amplio entre la infección y la manifestación de síntomas clínicos en los individuos afectados. En estas circunstancias, la transfusión de unidades de aféresis sí sería relevante por la menor exposición a donantes.

Respecto a los CPs de sangre total, la obtención de plaquetas de aféresis tiene algunos inconvenientes, como un mayor coste de producción, la necesidad de realizar el procedimiento en un centro fijo en lugar de unidades móviles, o la limitada disponibilidad de donantes altruistas dispuestos a dedicar el tiempo que dura el procedimiento, 1-2h frente a menos de 30 min para una donación de sangre total. Por otra parte está la seguridad del procedimiento. Aunque las donaciones de aféresis comparten muchas reacciones adversas con donaciones de sangre total, algunas son específicas al proceso de aféresis, como exponer a los donantes a niveles de citrato, que pueden ocasionar efectos adversos metabólicos, cardiovasculares y osteomusculares [75,76].

Aunque no hay estudios a largo plazo, no se ha objetivado en los donantes de aféresis con múltiples donaciones en un mismo año una inmunosupresión secundaria a la disminución de linfocitos secundaria al procedimiento [77].

Así pues, en términos de seguridad del donante, no existen argumentos a favor de la promoción de la donación de plaquetas mediante aféresis, frente al procesamiento de donaciones de sangre total.

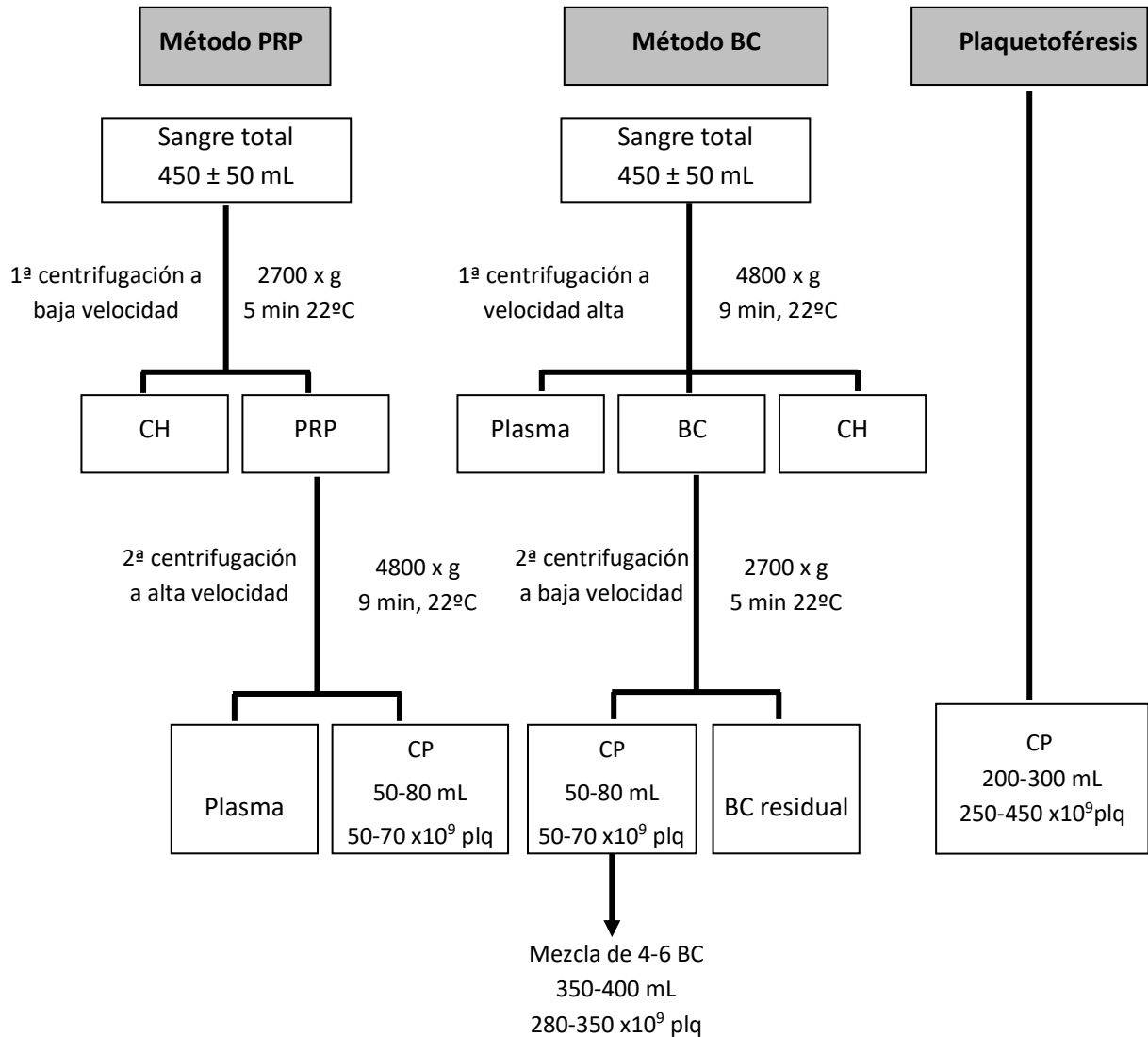


Figura 1. Métodos de obtención de CPs a partir de sangre total. BC= buffy coat; CH= concentrado de hematíes; CP= concentrado de plaquetas; PRP= plasma ricos en plaquetas.

3.3.2 Obtención de CPs de sangre total

3.3.2.1 Producción de CPs por el método de PRP

La introducción de envases de plástico a principios de los años 60, hizo factible la generalización de la terapia transfusional con plaquetas, lo que revolucionó el tratamiento de los pacientes trombocitopénicos. El primer tipo de procesamiento de la sangre total para obtener plaquetas que se desarrolló, es el llamado método de PRP [78].

Como muestra la figura 1, la unidad de sangre total, recogida en bolsas triples, o cuádruples si hay filtración para retirar leucocitos, se somete a una primera centrifugación a velocidad baja con la se consigue precipitar los hematíes y la mayoría de los leucocitos, manteniendo en el sobrenadante el PRP. Este producto plaquetario intermedio es derivado a una de las bolsas satélites, con la ayuda de una prensa manual o mediante fraccionadores automáticos desarrollados al efecto (Compomat y Optipress). Durante esta transferencia a la bolsa satélite, el PRP se puede hacer pasar a través de un filtro de retención de leucocitos en un proceso conocido como leucoreducción prealmacenamiento de CPs.

A continuación, el PRP es centrifugado a alta velocidad (3000-5000 x g; 5-10 min) para sedimentar las plaquetas en el fondo de la bolsa, dejando el plasma pobre en plaquetas (PPP) como sobrenadante. Usando de nuevo una prensa manual o un fraccionador automático, la mayor parte del plasma se deriva a una bolsa satélite adherida, para obtener una unidad de plasma, dejando unos 40-70 mL en la bolsa del CPs como solución de conservación. Una vez preparado, el CPs se deja en reposo 1-2 horas, para minimizar la activación plaquetaria y prevenir la presencia de agregados de plaquetas irreversibles en el CPs final. Después el CPs se pasa a un incubador de temperatura controlada (20-22°C) que proporcione además una agitación horizontal suave (100c/min). En estas condiciones se almacena hasta su uso dentro de los 5 días desde su obtención (7 si se hiciera detección de contaminación bacteriana o inactivación

de patógenos). El contenido medio de plaquetas en estos CPs obtenidos por el procedimiento de PRP oscila entre $4-8 \times 10^{10}$. Para preparar una dosis terapéutica de CPs-PRP ($>3 \times 10^{11}$ plaquetas), se deben agrupar 6-8 unidades de PRP de donantes individuales ABO compatibles. La mezcla se realiza habitualmente previo a su distribución para uso clínico. La mezcla pre-almacenamiento es posible si se dispone de bolsas de pools de plaquetas con una superficie y permeabilidad gaseosa.

En comparación con las aféresis de plaquetas, el uso de PRP es significativamente más barato de producir, y al no precisar de donantes seleccionados, disminuye el riesgo de escasez de producto en determinadas situaciones, como vacaciones o durante inclemencias meteorológicas. Unas de las principales diferencias respecto al resto de productos, es que el uso de PRP permite individualizar la dosis administrada a los pacientes [78].

3.3.2.2 Obtención de CPs por el método de buffy coat

En 1985, la Cruz Roja holandesa desarrollo un nuevo procedimiento de obtención de plaquetas de sangre total en el banco de sangre, conocido como método de BC. La principal ventaja de este nuevo método es que reduce significativamente el contenido en leucocitos residuales en los concentrados de hematíes y CPs, lo cual podría tener efectos beneficiosos para los pacientes transfundidos. Como en el método del PRP, en el fraccionamiento con el método de BC, las unidades de sangre se someten a una doble centrifugación (figura 1). La diferencia estriba en que la primera centrifugación es la más intensa de modo que se sedimentan todas las células sanguíneas. Las plaquetas se sitúan en la parte superior de la interfase entre los hematíes y el plasma sobrenadante. Es la llamada capa leucoplaquetaria o capa de BC. A continuación, y generalmente usando fraccionadores automáticos, se separan a distintos contenedores satélites el PPP sobrenadante y la capa leucoplaquetaria o BC, permaneciendo los hematíes en el contenedor original. La forma de realizar esta separación de componentes depende del tipo de bolsa que se emplea, ya que pueden tener puertos de salida solo en la parte superior (sistema de fraccionamiento

arriba/arriba), o disponer de estos puertos en los dos extremos (sistema de fraccionamiento arriba-abajo). Con éste último tipo, el paquete eritrocitario se deriva a una bolsa satélite a través de los puertos inferiores, el plasma a través de los superiores, y el BC permanece en la bolsa madre original. Independientemente del tipo de bolsa usada, los procedimientos optimizados concentran en los BC resultantes aproximadamente el 10% de los hematíes, el 70% de los leucocitos, y un 80% de las plaquetas iniciales en la sangre total.

Una vez obtenidos, los BCs se dejan reposar durante 2-18 horas. Por último, los BCs, generalmente en combinación con otras unidades ABO compatibles, se someten después a una segunda centrifugación más suave que precipita los glóbulos rojos y los leucocitos. Las plaquetas quedan en el sobrenadante y son transferidas de forma manual o automática, y con filtración en línea o sin ella, a la bolsa final de almacenamiento de plaquetas de uso clínico. La solución de conservación de plaquetas de BC puede ser únicamente plasma, pero la práctica habitual es usar una mezcla de plasma (20-40%) y de PAS (60-80%), lo que permite una mayor recuperación de plasma para otros fines. Este PAS suele añadirse al pool de BC antes de la segunda centrifugación. Los CPs obtenidos de la combinación de BC contienen aproximadamente 3×10^{11} plaquetas, dosis transfusional de un adulto, y como es lógico para su almacenamiento se requieren bolsas de alta capacidad, superficie, y permeabilidad de gases, que faciliten el mantenimiento de un pH adecuado durante todo el periodo de almacenamiento

En comparación con el método de producción de PRP, la técnica de producción de CPs por el método de BC ha mostrado diferentes ventajas logísticas para los centro de transfusión. Entre ellas, conseguir una mayor recuperación de plasma (50-100 ml/unidad), facilitar el almacenamiento en pools en lugar de unidades individuales, simplificar la incorporación de técnicas de detección de bacterias o de inactivación de patógenos, y permitir una mayor automatización y estandarización de la producción de plaquetas.

Por otra parte, los pocos estudios comparativos realizados apuntan a que el método de BC induce una menor activación plaquetaria y favorece la seguridad transfusional reduciendo la tasa de reacciones transfusionales, y disminuye la exposición a donantes en los pacientes transfundidos.

3.3.3 Equipos automáticos

Los equipos de fraccionamiento de segunda generación se desarrollaron con el fin de automatizar la preparación de CPs a partir de unidades de plaquetas BC y su resuspensión en PAS.

3.3.3.1 Orbisac

El dispositivo Orbisac está compuesto de una centrifuga con un sistema de expresión de líquido. El equipo requiere de un set Orbisac, que incluye una bolsa de agrupación o pool con una serie de líneas para permitir la unión de forma estéril de las unidades de BC, y la bolsa de PAS, o plasma, a usar como solución de conservación. Lleva además, la bolsa de la unidad de plaquetas final, a la que se transfieren las plaquetas del pool de BC a través de un filtro desleucotizador (Pall LRP6, Pall Corp., Port Washington, NY, EE. UU). Una vez realizadas la conexión estéril de las bolsa del BC y PAS al set Orbisac, el equipo realiza de forma automática la mezcla adecuada, la centrifugación suave para precipitar hematíes y leucocitos, y la transferencia a través del filtro desleucotizador, del sobrenadante rico en plaquetas a la bolsa de almacenamiento final y el sellado de ésta. La gran ventaja del equipo OrbiSac es por tanto que simplifica y estandarizara un procedimiento laborioso de producción de BC de seis pasos manuales. Así, con Orbisac es posible obtener de forma semiautomática, una unidad transfusional de plaquetas leucodeplecionada en tan solo 10-12 minutos [79].

En un estudio de un centro de transfusión, la implementación del equipo OrbiSac respecto al procesamiento manual, se tradujo en una disminución de la variabilidad de la cifra de plaquetas por pool, y una mayor eficiencia en el

procesamiento, lo que permitió la disminución de 6 a 5 unidades de plaquetas por CPs, con un contenido de plaquetas similar [80]. Algunos estudios han objetivo que el procesamiento por el equipo Orbisac no afecta significativamente a la características (morfología, reactividad) de las plaquetas *in vitro*, aunque si puede inducir a una mayor activación reconocida como un aumento expresión de CD62P [79].

3.3.3.2 TACSI

TACSI (Terumo Automated Centrifuge & Separator Integration system) es un equipo de producción de CPs automatizado diseñado para procesar hasta seis CPs-BC leucorreducidos en un solo proceso.

El equipo TACSI está compuesto de seis cubiletes (fijados en el rotor), para el montaje del kit de bolsas TACSI. Cada caja del dispositivo tiene incorporada una prensa, que es controlada y supervisada por un microprocesador individual. En una primera secuencia, después del acoplamiento estéril del BC y el plasma o PAS, los BCs se sedimentan en posición vertical. En el siguiente paso, se realiza una segunda centrifugación a 1200 rpm durante 3 minutos, que separa el contenido en una capa superior de plaquetas y una inferior con eritrocitos, entre otras células. En el siguiente paso, el sobrenadante rico en plaquetas se transfiere a una bolsa de almacenamiento mediante la activación del sistema de prensado en cada caja y se leucoreduce a través del filtro Imugard III-PL (Terumo BCT) situado entre la bolsa de agrupamiento o pool y la de almacenamiento. Con este equipo se alcanza una producción de 24 CPs-BC en una hora [79].

3.3.4 Equipos de fraccionamiento automatizado

Los nuevos equipos de procesamiento de sangre total tienen la ventaja respecto a sus antecesores, que en un único aparato se realizan de forma automática la mayoría de los pasos para obtener concentrados de hematíes, unidades de plasma y unidades de plaquetas. El primer equipo de esta generación

fue el equipo Atreus que ya no se encuentra disponible en el mercado en la actualidad.

3.3.4.1 Reveos

Reveos es un equipo automatizado y autónomo, que realiza el fraccionamiento de sangre total con un sólo proceso de centrifugación de intensidad intermedia. Este dispositivo integra en un solo equipo un fraccionador de componentes sanguíneos y una centrífuga con 4 cubiletes para colocar cuatro unidades de sangre extraída en el sistemas de bolsas específicas del Reveos. Este sistema de bolsa Reveos, está formado por la bolsa de colecta de sangre en ácido cítrico dextrosa (ACD-A) conectada a una serie de bolsas satélites para la derivación automática durante la centrifugación del concentrado de hematíes, el plasma, las plaquetas y el desecho leucocitario. Contiene además un filtro desleucotizador para filtrar los hematíes una vez obtenidos.

Reveos realiza de manera automática y simultánea el fraccionamiento de los componentes sanguíneos de las cuatro unidades de sangre colocadas en su interior. Además, Reveos realiza una monitorización y registro de datos de este proceso de separación (usuario, programa usado, tiempos, incidentes o errores en el proceso, etc.). Estos datos son accesibles en línea por parte del servicio técnico, y exportable a otros programas para su análisis y explotación posterior.

En el fraccionamiento con Reveos, el operador se identifica, selecciona el programa de separación a usar, coloca las bolsas y sus tubuladuras en los cubiletes del equipo y pulsa el botón de inicio. Una ventajosa diferencia frente a las centrífugas clásica es que en Reveos no es necesario pesar y equilibrar las bolsas de sangre, pues la centrifugación se realiza en posición casi vertical en cubiletes no oscilantes. En función de programa seleccionado, Reveos centrifuga en plano vertical durante un tiempo predeterminado. Sin dejar de centrifugar, Reveos realiza automáticamente la expresión de componentes a las distintas bolsas satélites ya que en cada cubilete se ubica una prensa hidráulica que actúa de forma, similar a los fraccionadores clásicos. De esta forma, primero se deriva

el plasma sobrenadante a la bolsa satélite correspondiente. Merced a los sensores ópticos incorporados, Reveos detecta la capa de BC y distingue en ella dos fases; la superior enriquecida en plaquetas y la inferior que contiene mayoritariamente los leucocitos de la unidad. La primera fase plaquetaria (20-30 mL) es derivada a una bolsa satélite del pequeño tamaño para constituir la unidad intermedia de plaquetas (IPU). La segunda fase se deriva a la bolsa satélite del desecho leucocitario. Los hematíes quedan en la bolsa Reveos de colecta de sangre. Este proceso de separación dura unos 15 min, tras lo cual los diferentes componentes se extraen del Reveos y se procesan separadamente. El plasma se congela; a los hematíes se les añade el contenido de la bolsa satélite de solución aditiva [sodio-adenina-glucosa-manitol (SAGM)] y después se filtran y transfieren por gravedad a la bolsa final de hematíes; las IPUS se dejan reposar 1-2 horas y se pasan al incubador de plaquetas hasta su uso posterior en la preparación de los pools o dosis transfusionales de plaquetas. La bolsa de leucocitos normalmente se desecha.

En realidad, el sistema Reveos dispone de cuatro protocolos de fraccionamiento diferentes, que varían mínimamente en la duración de la centrifugación y en la separación de componentes. Los protocolos 2C-A y 2C-B se usan cuando no se desea obtener plaquetas de la unidad de sangre. Así, en este caso Reveos fracciona solo el plasma, la capa leucoplaquetar completa, y los hematíes. Por el contrario, con los protocolos 3C-A y 3C-B, Reveos separa la sangre en plasma, plaquetas (IPU), desecho leucocitario y hematíes. La letra A y B en cada protocolo identifica el tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre: 2-12 horas en la opción A; entre 12-24 horas en la opción B. Esta variable afecta al grado de activación plaquetaria basal pre-centrifugación y en la validación de Reveos se observó que influye significativamente en la recuperación de plaquetas.

Otra ventaja adicional del dispositivo Reveos es que realiza automáticamente la estimación del volumen de los diferentes componentes sanguíneos, de manera que es innecesario pesarlos tras su obtención.

El último paso en el fraccionamiento de sangre con el sistema Reveos es la preparación de las unidades transfusionales o pooles de plaquetas, a partir de las IPU. Esencialmente, consiste en la unión estéril de 4-5 IPU ABO compatibles y una bolsa de 200-300 mL de PAS, la mezcla de su contenido y la filtración y derivación a la bolsa de plaquetas final. Este proceso está enormemente facilitado por:

1. La disponibilidad de un sistema de bolsas compacto para la preparación de los pooles (Platelet pooling kit, Terumo BCT)
2. La estimación automática por Reveso del volumen y contenido en plaquetas de cada IPU (PVI, platelet yield index). Estos datos son transferibles en línea al programa general de gestión de donantes y donaciones del Centro de Transfusión (Hematos IIG).
3. La disponibilidad de software, denominado T-IPU, específicamente diseñado por el fabricante de Reveos para la preparación de pooles de plaquetas de mezcla de IPU (CompoPool) Terumo BCT). Este programa importa los datos de cada IPU válido para uso clínico (volumen, contenido en plaquetas, grupos ABO), y calcula automáticamente las posibles combinaciones de 4 o 5 IPU a realizar para obtener pooles de plaquetas de cada grupo con un contenido en plaquetas mínimo pre-fijado por el operador. Una vez aceptada la propuesta de T-IPU que nos resulte más conveniente, el operador solo tiene que ir leyendo el número de unidad de cada IPU y el programa nos dice en que pool se ha de integrar. Con las IPU agrupadas de esta forma, los operadores realizan finalmente los pooles de plaquetas y los pasan al incubador de almacenamiento hasta su distribución para uso clínico.

Sin duda, la incorporación del sistema Reveos a los centros de transfusión ha supuesto una mejora a nivel de organización general del trabajo de fraccionamiento de la sangre, reduciendo las necesidades de espacio, y los movimientos de componentes, disminuyendo un 15-20% el tiempo de

procesamiento, y mejorando la comodidad y la productividad del personal de fraccionamiento. Un estudio ha mostrado que las características *in vitro* obtenidas por Reveos, parámetros metabólicos, respuesta al choque osmótico (HSR), o expresión de fosfatidilserina durante el almacenamiento son similares en comparación con plaquetas procesadas con el sistema Optipress II. No obstante se observó que las plaquetas obtenidas por el sistema Reveos tuvieron una mayor expresión de marcadores de activación (CD62P y niveles de citoquinas) [81].

3.3.5 Preparación de CPs con solución aditiva

Desde la década de los 80, las soluciones aditivas de plaquetas se han desarrollado como medio de almacenamiento de plaquetas con los siguientes propósitos: a) mitigar la lesión de almacenamiento y prolongar la vida útil de las plaquetas; b) aumentar la cantidad de plasma disponible para otros uso; c) reducir el riesgo de reacciones transfusionales debido al componente plasmático de un producto plaquetario. Además en los últimos años, ha aumentado el interés en el uso de PAS como una estrategia para mitigar la LPART y el daño plaquetario ocasionado por el tratamiento de inactivación de patógenos.

El estándar actual de almacenamiento plaquetario es una mezcla de plasma (generalmente 20-50%) y PAS (50-80%). Existen diferentes tipos de PAS que varían ligeramente en su composición. La mayoría contiene acetato, citrato y fosfato, como componentes principales, y algunas también sales de potasio y magnesio. La inclusión de otras sustancias como calcio, bicarbonato o glucosa tiene efectos significativos cuando la cantidad de plasma está por debajo del 5-20% [82–84].

Con el fin de evitar confusiones y armonizar la terminología, la ISBT (Sociedad Internacional de transfusión de sangre) ha propuesto una codificación estándar de las soluciones PAS, que es la usada en las definiciones de los componentes sanguíneos según su codificación ISBT 128. Así, las soluciones

actualmente en uso se codifican como PAS-A a PAS-G en función de su composición, y la lista podrá aumentar en el futuro [82]. La composición detallada de estas soluciones se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los diferentes PAS

Componente	PlasmaLyte A	PAS- II/PAS-B (T-Sol, SSP)	PAS- III/PAS-C (InterSol)	Composol PS/PAS-D	PAS-III M/PAS-E (SSP+)
NaCl	X	X	X	X	X
KCl	X	-	-	X	X
MgCl ₂	X	-	-	X	X
Na ₃ -citrato	-	X	X	X	X
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	-	-	X	-	X
Na-acetato	X	X	X	X	X
Na-gluconato	X	-	-	X	-

3.3.6 Obtención de CPs lavados

Los CPs lavados (CPs-LAV) son empleados tras una RTA grave, o en los raros casos de deficiencia de IgA o Hp [85]. El lavado de plaquetas es un proceso que tiene como objetivo el reemplazo del plasma del donante por suero salino o PAS. Con este fin, se somete a los CPs a 1 o 2 procesos de lavado realizados de forma manual [86–90] o mediante el uso de equipos automáticos [85,91,92].

Como hemos comentado previamente, el empleo de productos lavados disminuye un 90% la aparición de reacciones transfusionales, principalmente de tipo alérgico [67]. El inconveniente principal de este procedimiento de lavado es la pérdida de plaquetas, que varía entre el 10-40% en función de los procesos de lavados empleados [85–88,92]. Otro inconveniente es la alteración variable de la función plaquetaria, y su potencial efecto deletéreo sobre la eficacia de las plaquetas post-transfusión. El proceso de lavado se asocia a un aumento de la activación y alteraciones en los estudios de agregabilidad [86,91,92]. Otra limitación para el empleo de los CPs-LAV es su periodo de almacenamiento limitado a 4 horas según los estándares de AABB [56]. La razón de esta

limitación radica más bien en el riesgo de contaminación, pues se ha descrito una adecuada calidad *in vitro* de plaquetas lavadas y resuspendidas en soluciones aditivas, durante al menos 2 días después del lavado [93,94].

3.3.7 Producción de CPs inactivados

La prevención, detección e inactivación de patógenos son los tres pilares de cualquier programa de seguridad de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos que pretenda ser exitoso y eficiente. Durante la pasada década, las infecciones transmitidas por transfusión (ITT) se han reducido considerablemente debido a la estricta selección de donantes y a la mejora de los procedimientos de selección, secundario a la implementación de tecnologías para detectar infecciones endémicas y una mayor vigilancia en los diferentes pasos de la cadena de suministro de derivados hemáticos (colección, procesamiento y almacenamiento). Sin embargo a pesar de estas mejoras, la seguridad todavía es un motivo de preocupación porque no existe el riesgo infeccioso cero en la medicina transfusional [95]. En el contexto actual de globalización y de patógenos emergentes, existe la posibilidad de ITT para las cuales no disponemos de pruebas diagnósticas o no se realizan de forma rutinaria en los hospitales o en los centros proveedores.

Desde 1990, se han desarrollado varias técnicas de inactivación fotoquímicas de los CPs, con el fin de conseguir una disminución de la contaminación por patógenos en estos productos y a su vez, disponer de un complemento en la detección sistemática de patógenos. Los dos métodos comercialmente disponibles para la inactivación de los CPs son: i) inactivación con amotosaleno y luz ultravioleta A (UVA) (Sistema INTERCEPT, Cerus Corporation); ii) inactivación con riboflavina y luz UVA (Sistema MIRASOL, Terumo BCT). Existe además un tercer método en fase de desarrollo (Theraflex-UV) que sólo emplea radiación ultravioleta C para la inactivación.

Además de la esterilidad del componente sanguíneo, una ventaja adicional de las tecnologías de inactivación de patógenos es la inactivación simultánea de los linfocitos residuales en el componente tratado, lo que hace innecesaria la irradiación gamma o X para la profilaxis de la enfermedad de injerto contra huésped transfusional (EICHT). Adicionalmente, la inactivación de los patógenos, sobre todo bacterias, potencialmente presentes en las unidades de plaquetas permite la extensión de su vida útil de 5 a 7 días [96]. Ello ofrece substanciales ventajas en relación con la gestión del inventario de plaquetas en el centro de transfusión, la disponibilidad del producto y la pérdida de unidades por caducidad.

Los tratamientos de reducción de patógenos en plaquetas Intercept y Mirasol recibieron la certificación CE en 2002 y 2007, respectivamente. Ambos sistemas se usan de forma rutinaria en algunos países de Europa, incluyendo España. En EEUU, la FDA aprobó el uso de Intercept en CPs en diciembre de 2014, y el uso de Mirasol está en fase de evaluación clínica (MIPLATE clinical trial) de cara a su futura aprobación por la FDA.

Diferentes estudios han demostrado que tanto Intercept como Mirasol inactivan un amplio espectro de microorganismos, bacterias, parásitos y virus encapsulados en los componentes sanguíneos, mientras que son menos efectivos contra virus sin envoltura e inefectivos contra priones. Este grado de eficacia de inactivación de los diversos patógenos, se resume en la tabla 2. Uno de los inconvenientes potenciales de la inactivación de patógenos, es su impacto negativo en funcionalidad y eficacia hemostática de las plaquetas tratadas. Algunos estudios han analizado *in vitro* las propiedades de estos CPs inactivados mostrando que los distintos métodos, en mayor o menor grado inducen un daño oxidativo, un aumento de la activación plaquetaria y de la secreción de citoquinas, y una alteración de la reactividad plaquetaria. [96,97]. También se ha reportado un aumento de liberación de micropartículas durante el almacenamiento de CPs tratadas con Intercept o Mirasol. En estudios de transcriptómica se ha objetivado una disminución de los niveles de ARNm y

microARN en los CPs tratados con Intercept. Análisis de proteosoma han revelado también una alteración proteica en CPs tratados tanto con Intercept como con Mirasol [97].

Tabla 2. Grado de reducción logarítmica de patógenos

La eficacia terapéutica y la seguridad de los CPs inactivados han sido evaluadas en diferentes ensayos clínicos y metaanálisis. Aunque, en general, los pacientes transfundidos con CPs inactivados, frente a CPs estándar, muestran

	Amotosaleno/UVA	Riboflavina/UV	UVC
Virus encapsulados			
VHB	>5.5	2.3	Nd*
VHC	>4.5	3.2	Nd
VIH (libre)	>6.2	>5.9	1.4
VIH (asociado a una célula)	>6.1	>4.5	Nd
HTLV-1	4.7	Nd	Nd
CMV (asociado a una célula)	>5.9	Nd	Nd
Virus del Nilo Occidental	>6.0	>5.1	5.4
<i>Chikungunya</i>	>6.4	2.1	Nd
Virus <i>Influenza A</i>	>5.9	>5	Nd
Virus no encapsulados			
VHA	0	1.8	Nd
Parvovirus B19	3.5 a 5	>5	5.46
Bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i>	≥6.6	≥4	>4.8
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	≥6.6	4.2	4.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.5	4.6	4.9
<i>Escherichia coli</i>	≥6.4	4.4	>4
Bacteria spirochaete			
<i>Treponema pallidum</i>	>6.8	Nd	Nd
<i>Borrelia burgdorferi</i>	>6.8	Nd	Nd
Parásitos			
<i>Trypanosoma cruzi</i>	>5.3	6	Nd
<i>Plasmodium falciparum</i>	>6	>3.2	Nd

*Nd= información no disponible; CMV= citomegalovirus; HTLV-1= virus linfotrópico de células T humanas; VHA= virus hepatitis A; VHB= virus hepatitis B; VHC= Virus hepatitis B; VIH= virus inmunodeficiencia humana.

peores rendimientos transfusionales, con un menor incremento del recuento corregido (CCI), un mayor número de transfusiones de plaquetas y un aumento de las tasas de refractariedad, no se ha objetivado en estos pacientes una mayor incidencia de complicaciones hemorrágicas ni un aumento de la mortalidad [98]. Este discreto aumento en el número de transfusiones y la moderada reducción del rendimiento transfusional se explica tanto por la pérdida en la inactivación de Intercept y Mirasol (10-15% con Intercept; 3% con Mirasol), como por la alteración moderada de la “calidad” de las plaquetas [97].

Por último, resaltar que la ya larga experiencia clínica ha demostrado que las plaquetas inactivadas con Mirasol o Intercept son productos seguros que no incrementan la incidencia de RTA ni otros efectos adversos [98].

3.4 Almacenamiento de concentrados de plaquetas: Justificación y limitaciones

Como ya se ha mencionado arriba, la transfusión de plaquetas tiene por objeto detener o prevenir el sangrado en enfermos con alteraciones en el número o función de las plaquetas. Para poder alcanzar este objetivo clínico, es determinante que los procedimientos de preparación y las subsiguientes condiciones de almacenamiento de los CPs, no disminuyan de forma irreversible e inaceptable el poder hemostático de estas plaquetas una vez transfundidas, ni su capacidad para mantenerse viables en la circulación sanguínea durante el mayor tiempo posible.

Actualmente, el estándar universalmente aceptado para el almacenamiento de los CPs destinados al uso clínico, tanto de sangre total como los obtenidos mediante aféresis, observa los siguientes principios fundamentales:

- a) La temperatura de almacenamiento estará comprendida entre 22-24 °C.

- b) El contenedor o bolsa de almacenamiento debe ser de un material plástico con escasa capacidad de migración hacia el producto, y con la necesaria permeabilidad gaseosa para permitir la actividad metabólica de las células.
- c) Durante todo el periodo de almacenamiento, excepto 1-2 horas tras el fraccionamiento, se mantendrá una agitación suave del CPs.
- d) El CPs deberá contener un volumen suficiente de plasma, o solución sustitutiva, para garantizar el aporte de los substratos metabólicos requeridos por las plaquetas durante todo el periodo de almacenamiento.
- e) La duración máxima del almacenamiento para uso clínico será de cinco a siete días a contar desde la donación.

Como vamos a comentar a continuación, el establecimiento de estos principios en el almacenamiento de los CPs, no es arbitrario sino fruto de los estudios realizados y de la experiencia adquirida a lo largo de seis décadas, y de la aplicación continuada de los avances tecnológicos en este campo. Actualmente estos principios, aunque no se consideren óptimos, son aceptados universalmente como los menos desfavorables para el obvio propósito de preservar suficientemente la capacidad hemostática y la viabilidad post-transfusional suficiente en las plaquetas almacenadas.

3.4.1 Almacenamiento líquido a temperatura ambiente

Como se ha comentado anteriormente, éste es el estándar de almacenamiento de los CPs de uso clínico. Este almacenamiento, a diferencia del almacenamiento refrigerado, no afecta de forma significativa a la supervivencia de las plaquetas en la circulación tras la transfusión. Sin embargo este almacenamiento tiene consecuencias no deseables, como cambios estructurales y funcionales que se conocen como LPA. El desarrollo de la lesión de

almacenamiento se asocia con una disminución de la recuperación, supervivencia y función *in vivo*. Un segunda desventaja, radica en la mayor tasa de contaminación bacteriana de todos los productos sanguíneos debido al rápido crecimiento de bacterias a 20°C-24°C [99]. Aunque en la actualidad, medidas como la eliminación de los primeros 30 ml de cada transfusión o la desinfección en la zona de punción, han disminuido de forma drástica esta complicación [100].

Un tercer inconveniente de las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente se debe a que precisan una agitación casi constante para mantener el intercambio de gases y el metabolismo aeróbico, lo que agrega una complejidad adicional para almacenar y transportar las unidades de plaquetas [101].

3.4.2 Almacenamiento refrigerado

Desde la década de 1960 hasta la década de 1980, los CPs se podían almacenar tanto a 22°C como a 4°C. Las ventajas de un almacenamiento a 4°C consistían en una reducción del riesgo de contaminación bacteriana, facilidades logísticas al no precisar agitación, o un enlentecimiento del metabolismo celular en comparación con el almacenamiento a 22°C. A pesar de estas ventajas, dado que la mayoría de las transfusiones se realizaban con el fin de incrementar el número de plaquetas circulantes, se abandonó el uso de CPs a 4°C por su menor viabilidad, como hemos comentado previamente.

El uso de CPs refrigerados a 4°C está aprobado por la FDA con una duración máxima de almacenamiento de 72 horas, aunque su uso habitual no está extendido [102]. Recientemente, ha habido un resurgimiento del interés por las plaquetas almacenadas a 4°C por sus mejores capacidades hemostáticas. Las plaquetas almacenadas a 4°C, al igual que las plaquetas almacenadas a 22°C, sufren una serie de cambios que se describen colectivamente como la lesión plaquetaria por frío. Estos consisten en una serie de cambios irreversibles en la morfología, un incremento en la apoptosis, y una mayor activación, incluyendo

una mayor producción de tromboxano A₂, micropartículas y una mayor expresión superficial de P-selectina y glicoproteína (GP) Iba [99,102]. Sin embargo, precisamente debido a este grado de preactivación, las plaquetas almacenadas a 4°C tienen una mejor adherencia, una mayor capacidad de agregación, y una formación de coágulos más rápida, que se traduce en una reducción en los tiempos de sangrado [99,102]. El almacenamiento a 4°C, además de disminuir el crecimiento bacteriano, enlentece el metabolismo celular, manteniendo niveles adecuados de glucosa, pH o bicarbonato durante al menos 21 días por lo que se podría extender el almacenamiento por encima de los 7 días [102,103].

Diferentes grupos están investigando diferentes métodos para mejorar la viabilidad de las plaquetas después del almacenamiento en frío, incluyendo la supresión metabólica con un medio libre de glucosa e inhibición de la síntesis mitocondrial de adenosina trifosfato (ATP), el empleo de diferentes ciclos de temperatura durante el almacenamiento, o el empleo de solución aditiva [99,103].

Las plaquetas almacenadas en frío serían fáciles de integrar en las cadenas de suministro de productos sanguíneos, ya que los glóbulos rojos se almacenan actualmente en condiciones similares. Sin embargo, es poco probable que su uso sea adecuado en la transfusión profiláctica en pacientes con trombopenia debido a su corto tiempo de circulación. Mantener inventarios mixtos de plaquetas frías y a temperatura ambiente puede ser un reto, pero en última instancia necesario si los ensayos clínicos demuestran que las plaquetas almacenadas en frío son superiores en el control de la hemorragia activa.

3.4.3 Almacenamiento criopreservadas

La corta vida útil de las plaquetas provoca que en determinados contextos, como en operaciones militares, pacientes con genotipos de plaquetas poco frecuentes o en centros sanitarios situados a grandes distancias de los centros transfusionales, la adecuada disponibilidad de CPs sea un desafío adicional

[104]. En esta situación una alternativa puede ser el uso de CPs criopreservados. Esta forma de CPs fue desarrollada por la marina de EEUU en la década de 1970 y consistió en la congelación de plaquetas con dimetil sulfóxido (DMSO). Distintas variables pueden afectar a la calidad de estas plaquetas criopreservadas incluyendo la concentración de DMSO, el ritmo de congelación, la bolsa de almacenamiento utilizada, el almacenamiento en vapor de nitrógeno líquido o en un congelador a -80°C , y la duración del almacenamiento. En la actualidad, los protocolos de criopreservación más utilizados contemplan la adición de DMSO (en una concentración final de 4-6%), con una hiperconcentración posterior del producto y una congelación con un descenso de temperatura no controlado en un congelador a -80°C durante un máximo de 2 años [105].

Al igual que las plaquetas refrigeradas, los estudios *in vitro* en plaquetas criopreservadas demuestran que tiene efecto deletéreo en las plaquetas incluyendo, una alteración morfológica, funcional y un incremento del metabolismo tras la descongelación. Sin embargo, muestran un fenotipo activado, con una mayor expresión de P-selectina o un mayor número de micropartículas, lo que puede explicar la reducción en el tiempo de formación de coágulos [102,104,106].

El uso de plaquetas criopreservadas ha sido investigado en diferentes contextos clínicos, como pacientes con cáncer o cirugía cardiorácica [105] y sobretodo, en el ámbito militar [107]. Llamativamente en pacientes quirúrgicos, el uso de plaquetas criopreservadas conseguía una hemostasia equivalente, si no mejor, que las plaquetas estándares [105].

A pesar de los avances en la criopreservación, la FDA no ha aprobado este producto. Las plaquetas criopreservadas tiene una recuperación y un CCI un 50% inferior al de las plaquetas frescas o almacenadas a 22°C durante 5 días. Además de sufrir una pérdida media de plaquetas del 28% durante el proceso [105]. En línea con estos datos, un estudio reciente en voluntarios sanos mostró que la transfusión de CPP cumple con los criterios de la FDA de supervivencia, pero no con los de recuperación en 24 horas necesarios para su aprobación [104].

3.4.4 Plaquetas liofilizadas

La liofilización de plaquetas es otra forma potencial de conservación de plaquetas, que permitiría un almacenamiento casi indefinido. Los primeros estudios de liofilización de plaquetas se describieron en la década de 1950, pero el método descrito no mantenía la estructura plaquetaria ni la efectividad hemostática. En los años 90, el proceso de liofilización se mejoró estabilizando las plaquetas con paraformaldehído. Una vez rehidratadas, estas plaquetas liofilizadas conservaban gran parte de la funcionalidad *in vitro* de las plaquetas frescas (adhesiva y procoagulante).

Recientemente, se ha descrito otra metodología donde las plaquetas son cargadas con trehalosa antes de la liofilización. Después de la rehidratación, el porcentaje de recuperación es del 80%, observándose un aumento del volumen plaquetario medio (VPM), en comparación con plaquetas frescas y cierto grado de preactivación plaquetaria, con expresión de P-selectina y GPIIb-IIIb en el 40% de las plaquetas. La evaluación de la agregabilidad o del tiempo de formación de coágulos fue muy parecido al de las plaquetas frescas. Sin embargo, hasta la fecha no hay datos de ensayos clínicos evaluando su seguridad y eficacia [99].

El empleo cada vez más frecuentes de CPs con fines terapéuticos en la práctica clínica, o la escasez de éstos en situaciones de conflictos bélicos o medios rurales alejados de centros productores, ha abierto de nuevo el debate de que producto es el más indicado en función del motivo de la transfusión. A día de hoy, parece que el almacenamiento líquido a 22°C es la mejor opción para conservar en el banco de sangre los CPs destinados a la transfusión. No obstante, este modo de conservación no puede considerarse óptimo, puesto que no evita dos problemas relevantes, el deterioro progresivo de las plaquetas o LPA, que comentaremos más en detalle a continuación, y el riesgo de contaminación bacteriana.

3.5 Lesión plaquetaria de almacenamiento

La lesión plaquetaria de almacenamiento se define como el conjunto de cambios deletéreos en la estructura y función de las plaquetas que se producen desde el momento en que se extrae la sangre del donante hasta el momento en que se transfunden las plaquetas al receptor [108].

El grado de alteración morfológica y funcional de las plaquetas influye en su eficacia hemostática *in vitro* y posiblemente *in vivo*. Estas alteraciones dependen de una serie de variables, como el método empleado para preparar los CPs, PRP o buffy coat, tiempo de almacenamiento y temperatura, tipo de recipiente plástico y plastificante, la agitación continua de los concentrados, la aplicación de técnicas de inactivación de patógenos en los CPs y la naturaleza del medio de suspensión [109].

Se dispone de múltiples métodos que analizan diferentes aspectos de la función plaquetaria. Sin embargo, existe una falta de conocimiento de cómo estas pruebas se correlacionan con la recuperación, supervivencia y eficacia hemostática de las plaquetas cuando se transfunden en pacientes trombocitopénicos o con hemorragia activa. Esta aparente discrepancia entre los experimentos *in vitro* y los estudios *in vivo* se debe a que muchos de los ensayos actualmente disponibles sólo proporcionan información fragmentada de las funciones hemostáticas de las plaquetas, y/o a que parte de los defectos producidos durante el almacenamiento e identificados en los estudios *in vitro* pueden ser reversibles tras la transfusión.

Las alteraciones plaquetarias que se producen de forma progresiva durante el almacenamiento de CPs en el banco de sangre, se pueden clasificar en:

3.5.1 Cambios morfológicos, activación y metabólicos

Debido a que la preparación de las plaquetas causa cambios que se asemejan a la activación plaquetaria, algunas de las pruebas de laboratorio

utilizadas para evaluar las plaquetas almacenadas son las mismas que las utilizadas para estudiar la activación plaquetaria. Al activarse, las plaquetas pasan de discoideas a esféricas y emiten pseudópodos, como consecuencia del reordenamiento del citoesqueleto. La morfología discoidea plaquetaria se correlaciona bien con la viabilidad *in vivo* de las plaquetas y se sabe que los factores que afectan a la morfología discoidea, como la disminución del pH por debajo de 6,4, la exposición al frío, o LPA, afectan la viabilidad plaquetaria. Esta alteración morfológica se puede visualizar directamente por microscopía, o valorarse por el cambio en el patrón de distribución del tamaño de las plaquetas, o la pérdida del efecto remolino o *swirling* [110].

Hace 30 años, Kunicki y colaboradores desarrollaron un sistema de puntuación para evaluar la calidad de las plaquetas almacenadas, basado en el cálculo del número de plaquetas discoideas respecto a las esféricas de la muestra. Este sistema sigue siendo una herramienta válida para determinar la calidad de las plaquetas [111]. Estos cambios morfológicos también puede ser evaluados *in vitro*, como una pérdida de respuesta de HSR, o en la disminución de la extensión del cambio de forma (ESC) que puede inducirse con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y adenosina difosfato (ADP). Tanto la respuesta HSR como ESC disminuyen a lo largo del almacenamiento, y una adecuada conservación de estos parámetros se ha correlacionado con una mayor viabilidad de las plaquetas almacenadas tras su transfusión [112]

Además de estas técnicas, en la última década, se han incorporado al estudio de la morfología plaquetaria técnicas basadas en el principio de la dispersión de luz dinámica, como el equipo ThromboLUX (Lightintegra Technology, Vancouver, BC, Canada). Este equipo determina el número y forma de las plaquetas y micropartículas presentes en los CPs, y su cambio relativo de tamaño en respuesta a ciclos de temperatura (de 37°C a 20°C y de nuevo a 37°C) [113,114]. Esta información se combina en un parámetro llamado puntuación ThromboLUX DLS. Los concentrados con una puntuación inferior o igual a 12 son de mala calidad, mientras que una puntuación superior a 12 designa un

producto de buena calidad. De hecho, la puntuación de ThromboLUX DLS se ha correlacionado fuertemente con el CCI, sugiriendo que la puntuación proporciona información sobre la calidad del concentrado que está en estrecha relación con la CCI [114].

El proceso de activación da lugar a la degranulación plaquetaria, ocasionando la expresión en la superficie plaquetaria de proteínas de los gránulos, como P-selectina (CD62P), CD63 y CD40L, y de fosfolípidos negativos como fosfatidil serina (PS), o cambios en la expresión de glicoproteínas en la superficie plaquetaria (GPIb, GPIIb, y GPIIIa). La degranulación plaquetaria también se puede evaluar midiendo las moléculas bioactivas almacenadas en los gránulos *a* plaquetarios liberadas al medio, como el β -tromboglobulina, el factor plaquetario 4, y RANTES [108,115].

Los cambios conformacionales en el complejo GPIIb/IIIa exponen los sitios de unión para las proteínas adhesivas (fibrinógeno, factor de Von Willebrand) resultando en agregados plaquetarios [108]. La activación estimula aún más la liberación de contenidos granulares y la expresión de proteínas de membrana secuestradas en la superficie exterior. La liberación de estos contenidos granulares en el sitio de la lesión es indispensable para la función plaquetaria, ya que los contenidos no sólo median el reclutamiento de leucocitos y plaquetas, promueven la coagulación, sino que también proporcionan inmunidad contra la infección y contribuyen a la cicatrización de la herida [1,2]. Además, la presencia de estos contenidos en el medio de almacenamiento se asocia a la aparición de RTA [32,42,108].

La exposición a fuerzas de cizallamiento, durante la separación de los componentes en la centrifugación o durante la agitación en el almacenamiento no sólo activa las plaquetas, sino que también puede causar lisis y activación de proteasas, como la calpaína. La lisis plaquetaria conduce a la liberación y acumulación de la enzima lactato deshidrogenasa citosólica (LDH) y contenidos granulares. La activación de la calpaína ocasiona la degradación de proteínas citoesqueléticas como actina, talina y proteína de unión a la actina generando

microvesículas plaquetarias. La formación de microvesículas provoca una disminución del volumen plaquetario medio (VPM) y también contribuye a la actividad procoagulante [108].

Las plaquetas, al igual que otras células, utilizan la energía para una variedad de procesos bioquímicos asociados con la activación, y su principal fuente de energía es la hidrólisis de ATP. Las plaquetas disponen de un depósito metabólico de nucleótidos, ADP y sobre todo ATP, que proporciona energía para los cambios necesarios durante la activación, y para el mantenimiento de la integridad celular, tanto en la circulación como durante el almacenamiento *in vitro*. La reducción en la concentración de ATP o el cambio en la relación ATP/ADP (medible por ejemplo con un ensayo de luciferina-luciferasa o por cromatografía líquida de alta eficacia) es un índice de LPA que se correlaciona bien con la caída del pH y el consumo de glucosa [116,117].

Durante el almacenamiento de los CPs, tanto la glicólisis como la fosforilación oxidativa regeneran el ATP para evitar el agotamiento energético. Las plaquetas tienen una tasa glicolítica destacada, significativamente superior a la de los eritrocitos y músculo esquelético, lo que resulta en una producción de lactato y de cationes de hidrógeno incrementada. Si los CPs contienen plasma en cantidad suficiente (0.65 mL/10⁹ plaquetas), el bicarbonato presente (aproximadamente 20 mM) es suficiente para mantener el pH en rango adecuado (6.8-7.4) durante al menos una semana de almacenamiento. En caso de agotarse el bicarbonato durante el almacenamiento resulta en una disminución perjudicial del pH que aumenta el daño plaquetario.

Finalmente, debido a que el nivel de oxígeno en el recipiente de almacenamiento plaquetario tiene impacto en la calidad plaquetaria, los niveles de pO₂ y pCO₂ se analizan para garantizar que se ha producido un intercambio de gases suficiente durante el almacenamiento. Además de los niveles de pO₂ y pCO₂, el pH y los niveles de glucosa son medidas indirectas de riesgo de contaminación bacteriana, ya que el crecimiento bacteriano acelera el metabolismo energético en el medio de almacenamiento [109].

Por lo motivos previamente indicados, los marcadores usados más frecuentemente para estimar el estado metabólico de los CPs durante el almacenamiento, la calidad *in vitro* de los CPs y el grado de LPA relacionado, son el pH, los niveles de glucosa, bicarbonato, y lactato, y los valores de pO₂ y pCO₂ [116,118].

A los estudios tradicionales previamente descritos, se han complementado con técnicas más sofisticadas como la metabolómica o proteómica para el estudio de LPA. La investigación inicial sobre proteómica plaquetaria se centró en la cartografía general del proteoma, y posteriormente en los compartimentos subcelulares, el proteoma de la membrana y las vías de señalización [117]. En el caso de la metabolómica, los estudios descriptivos han representado el primer paso que los investigadores han dado en el campo de la medicina transfusional, como la descripción de las etapas metabólicas durante el almacenamiento plaquetario [119]. El siguiente paso en esta técnica ha sido la correlación de estos hallazgos con resultados transfusionales. Así Zimring y colaboradores han descrito que la presencia en los CPs de metabolitos de cafeína, o de acilcarnitinas, los metabolitos de ácidos grasos particulares, y los ácidos grasos oxidados, se asocia con una recuperación o supervivencia disminuida de las plaquetas tras la transfusión. En conjunto, estos hallazgos nos proporcionan nuevas perspectivas mecanicistas sobre la biología funcional de la LPA, así como la identificación de posibles objetivos para modificar factores relacionados con el donante (por ejemplo, el consumo de cafeína) y también nuevos parámetros para evaluar la calidad de los CPs almacenados [120].

3.5.2 Cambios que reflejan daño en la membrana plaquetaria y/o muerte celular

La lesión plaquetaria durante el almacenamiento también está asociada con una alteración de la composición de los lípidos en la membrana plasmática. Estos cambios incluyen la pérdida de la asimetría de la composición lipídica de la

membrana, similar a la que ocurre después de la activación inducida por un agonista, que ocasiona una pérdida significativa de la cantidad de lípidos, lo que muy probablemente resulte de la microvesiculación de ésta. Los cambios implican la exposición superficial de fosfolípidos cargados negativamente, principalmente PS, que son necesarios para el ensamblaje de complejos procoagulantes dependientes de Ca^{2+} : tenasa (FIXa y FVIIIa) y protrombinasa (FXa y FVa) [116].

La apoptosis plaquetaria está regulada por una vía dependiente de la mitocondrias, y puede ser desencadenada por múltiples estímulos químicos externos, y por la exposición de las plaquetas a esfuerzos de cizallamiento. En la actualidad disponemos de múltiples pruebas *in vitro* para determinar marcadores de apoptosis, como la despolarización de la membrana interna mitocondrial, la liberación de citocromo c, la expresión de proteínas pro-apoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, la activación de la caspasa 3, la exposición de la fosfatidilserina, la disminución del volumen plaquetario, la fragmentación a micropartículas, y cambios morfológicos [121]. Tradicionalmente, un marcador simple de la lisis celular y pérdida de viabilidad de los CPs, es el aumento de actividad LDH en el sobrenadante, a menudo acompañado de una reducción en el recuento de plaquetas y un aumento en el volumen medio de las plaquetas [122].

La apoptosis plaquetaria que ocurre simultáneamente durante el almacenamiento contribuye aún más a la pérdida de la función mitocondrial, daño citoesquelético, y la expresión superficial de la PS. Además, el consumo de nutrientes por parte de las plaquetas y los leucocitos contaminantes y la acumulación de productos metabólicos como los residuos celulares, factores de coagulación activados, enzimas proteolíticas, y las citoquinas en el plasma también afectan negativamente a la integridad funcional de las plaquetas.

3.5.3 Valoración *in vitro* del estado funcional de las plaquetas almacenadas

De todas las respuestas funcionales de las plaquetas, la agregación es probablemente la más ampliamente investigada. La prueba de referencia es la clásica agregometría de transmisión de luz simple (Light-transmission aggregometry [LTA]). La estimulación con diferentes concentraciones y combinaciones de agonistas fisiológicos (por ejemplo, ADP, colágeno, epinefrina, trombina) proporciona una cantidad considerable de información sobre las diferentes vías de activación plaquetaria. En las plaquetas funcionales, un estímulo suficiente da como resultado la exposición de los sitios de unión al fibrinógeno a los receptores GPIIb/IIIa y, en presencia de fibrinógeno externo, un proceso de agregación que se puede seguir ópticamente como un aumento en la transmisión de la luz. Las plaquetas almacenadas en los concentrados responden mal a la acción de agonistas débiles como epinefrina, ADP y colágeno. En contraste con la agregación inducida por trombina, las plaquetas almacenadas en comparación con unidades frescas también se deterioran, aunque en menor medida [116]. Sin embargo, el estudio de agregación en CPs no reflejan el comportamiento *in vivo* de las plaquetas transfundidas, por ejemplo, los CPs almacenados a 4°C tienen mejor capacidad de agregación que los almacenados a 22°C a pesar de su baja recuperación y supervivencia [114,123].

Como hemos comentado previamente, la activación plaquetaria produce una agregación plaquetaria y liberación de los gránulos. Basados en este principio, se han desarrollado otras pruebas como, la agregación en sangre total basada en el aumento de la impedancia que se produce tras la unión de las plaquetas a múltiples electrodos (Impedance aggregometry- multiple electrode aggregometry (MEA)), el aumento de la luminiscencia provocada por el paso de ADP a ATP y su reacción con el reactivo luciferina-luciferasa (Lumiaggregometría), o la capacidad de las plaquetas activadas para unir fibrinógeno que es la base del equipo compacto denominado VerifyNow system®.

La mayoría de estas pruebas se han utilizado para el control del tratamiento antiplaquetario o el estudio de defectos plaquetarios [124]. Aunque estudios con MEA se han utilizado para valorar el efecto sobre los CPs de distintos equipos de aféresis, no se dispone de suficientes datos para recomendar este estudio para evaluar la calidad de los CPs [114].

Debido a que las pruebas de agregación previamente descritas evalúan la agregación plaquetaria en condiciones de bajo flujo, esta prueba no simula con precisión la adhesión plaquetaria *in vivo*. En este sentido, se han desarrollado equipos, que intentan valorar la reactividad plaquetaria en condiciones de flujo alto, como el analizador de función de plaquetas 100 (PFA-100®/Innovance PFA-200®, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Germany.) o el analizador de cono y placa (let), denominado impact-R® (DiaMed, Suiza). Ambas pruebas miden la adhesión y la agregación plaquetaria en condiciones de alto cizallamiento y requieren sangre entera anticoagulada [125]. En general, en los estudios con PFA-100® o impact-R® se ha observado una reducción de la capacidad funcional de las plaquetas a lo largo del almacenamiento.

La tromboelastografía y la tromboelastometría son otras metodologías empleadas para la evaluación global del proceso hemostático. Estos ensayos investigan el desarrollo completo de la formación de coágulos y se basan en el análisis de modificaciones en las fuerzas viscoelásticas durante la formación de coágulos. De hecho, el potencial de esta metodología está relacionado con la evaluación del grado de recuento y función de las plaquetas, coagulación y activación fibrinolítica. En estas pruebas, las plaquetas desempeñan todas sus funciones en la hemostasia: generación de trombina, formación de coágulos, retracción de coágulos y lisis [124].

En la actualidad, existen equipos automatizados de tromboelastografía y tromboelastometría como TEG® (Haemonetics, EEUU) y ROTEM® (Pentapharm, Suiza) [125]. El principio de este método consiste en un sistema rotativo que incluye un perno suspendido por un alambre de torsión en una copa. La adición de reactivos y el esfuerzo de cizallamiento del sistema rotatorio, da

lugar a la formación del coágulo que atrapa al perno promoviendo un movimiento que aumenta a medida que el coágulo se fortalece y disminuye a medida que el coágulo se lisa. Con estas técnicas no es posible medir la viscosidad sanguínea ni detectar el inicio de la coagulación, ya que las primeras señales aparecen cuando el perno se une a las primeras fibras de fibrina que abarcan toda la distancia a la pared de la copa. La adición de diferentes compuestos nos permite estudiar aspectos específicos de la hemostasia [125].

El TEG y el ROTEM se han utilizado para evaluar la función plaquetaria y los cambios asociados al almacenamiento en CPs almacenados en temperatura ambiente, observando una disminución en el tiempo de reacción del coágulo y el tiempo en el que la amplitud del coágulo aumenta de 2 a 20 mm, disminuyendo ambos tiempos durante el almacenamiento, como consecuencia del aumento de la actividad procoagulante (aumento de la expresión de fosfatidilserina en la superficie de la célula), la activación del complejo GPIIb/IIIa, y otros efectos de la LPA, que aumentan la reactividad de las plaquetas [126]. Las mediciones de TEG y ROTEM también son adecuadas para la evaluación de plaquetas criopreservadas, que tienen un tiempo de reacción del coágulo reducido en comparación con las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente, pero con una resistencia del coágulo disminuida [106]

La reometría de oscilación libre (FOR) (MediRox AB, Suecia) es una tecnología más reciente que permite medir los cambios de viscosidad y elasticidad en la coagulación de la sangre total y en la disolución de coágulos y obtener resultados en unidades SI. El análisis FOR incluye la medición simultánea de la viscosidad sanguínea y, por lo tanto, permite detectar incluso las fases iniciales de la coagulación.

En conclusión, todos los métodos miden diferentes aspectos de la función plaquetaria con el objetivo de determinar el papel de las plaquetas en la hemostasia. Desafortunadamente, podemos afirmar que no disponemos de una prueba clínicamente útil que proporcione datos precisos y reproducibles entre los diferentes laboratorios. A su vez, existe una escasez de datos que apoyen el uso

de algunas de las pruebas disponibles hoy en día, dado que sólo unas pocas variables se han relacionado con suficiente evidencia científica con resultados clínicos.

Sin embargo, la disponibilidad de nuevos equipos y el conocimiento adquirido sobre la fisiología plaquetaria pueden permitir que surjan datos para que una u otra aplicación sea significativa para la investigación y el uso clínico.

Objetivos del Proyecto

4. Objetivos

En este Proyecto de Tesis Doctoral hemos realizado tres investigaciones específicas encaminadas a:

- 1) Comparar la calidad *in vitro* de plaquetas buffy coat procesadas por distintos equipos semiautomáticos, OrbiSac y TACSI.
- 2) Evaluar el rendimiento transfusional de CPs obtenidos por los métodos de PRP y de buffy coat, en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Adicionalmente en este estudio se ha pretendido evaluar la potencial relación del tipo de producto plaquetario con variables clínicas como el sangrado o la mortalidad secundaria a éste, o el intervalo entre transfusiones o hasta un primer episodio hemorrágico grado ≥ 2 .
- 3) Implementar un sencillo método de lavado de CPs con solución aditiva plaquetaria, evaluar *in vitro* la calidad de las plaquetas lavadas con este método, y valorar su eficacia clínica en pacientes con hemopatía maligna.

***CAPÍTULO I: Evaluación de la calidad de los
concentrados de plaquetas buffy coat
leucodepleccionados preparados por el
sistema automatizado OrbiSac o TACSI***

5. CAPÍTULO I: Evaluación de la calidad de los concentrados de plaquetas buffy coat leucodepleccionados preparados por el sistema automatizado OrbiSac o TACSI

Resumen

Antecedentes

En muchos países los concentrados de plaquetas (CPs) más utilizados son los obtenidos por el método buffy coat (BC). Como alternativa a la preparación manual de los CPs, se han incorporado a los centros de transfusión dos equipos automáticos, OrbiSac y TACSI.

El objetivo de nuestro estudio es comparar la calidad *in vitro* de los CPs preparados con los dos dispositivos a lo largo de un almacenamiento estándar.

Material y métodos

Se prepararon 20 pools de BC que se dividieron en dos unidades. Una unidad se procesó con el equipo Orbisac y la otra con TACSI para obtener CPs de OrbiSac (CPs-O) y CPs de TACSI (CPs-T), respectivamente. En los días 1, 5 y 7 se obtuvieron muestras para el análisis del conteo celular, parámetros metabólicos, funcionalidad y activación plaquetaria, y moléculas pro-inflamatorias.

Resultados

Los CPs obtenidos tanto por el equipo OrbiSac y TACSI cumplieron con los estándares de los productos plaquetarios en relación con el contenido de

plaquetas y leucocitos. La evaluación *in vitro* del metabolismo plaquetario (pH, glucosa, bicarbonato y lactato) mostró una preservación similar en los CPs-O y CPs-T. Además, no hubo diferencias en el test de respuesta al choque osmótico o en el estudio de agregación plaquetaria entre CPs-O y CPs-T. Sin embargo, el sistema OrbiSac causó una mayor activación plaquetaria, lo que ocasionó mayores concentraciones de sCD62P, RANTES y sCD40L en el día de la preparación de los CPs.

Conclusiones

Los equipos OrbiSac y TACSI se puede utilizar para producir CPs obtenidos por BC, cuyo contenido celular, función plaquetaria y metabolismo son similares durante un almacenamiento estándar. Sin embargo, la preparación con el sistema OrbiSac induce un incremento transitorio en la activación de plaquetas y liberación de sustancias proinflamatorias.

Introducción

El uso de concentrados de plaquetas (CPs) como terapia transfusional, se ha convertido en una herramienta fundamental en la medicina actual, que permite la realización de procedimientos quirúrgicos, utilización de esquemas de quimioterapia agresivos o el manejo de procesos hemorrágicos en pacientes con alteraciones de la hemostasia [127]. Estos productos se pueden obtener de forma selectiva de un donante por plaquetoaféresis o bien a partir de varias donaciones de sangre total [75,78]. El empleo de cada uno de estos productos varía entre países e instituciones, con una media aproximada de 50:50 en Europa. En la mayoría de países desarrollados, a excepción de Estados Unidos, el método clásico de plasma rico en plaquetas (PRP) ha sido sustituido por el procedimiento de buffy coat (BC), como método de rutina para preparar los CPs obtenidos de sangre total [78]. Mientras los CPs obtenidos mediante BC y PRP son muy similares en cuanto a sus propiedades *in vitro*, supervivencia y eficacia transfusional [75,78,128,129], la metodología de BC ha facilitado y permitido la automatización y el empleo de nuevas estrategias de preparación de CPs, como la unión de unidades de plaquetas prealmacenamiento para obtener CPs con dosis transfusionales adecuadas, la leucodeplección universal y la inactivación de patógenos.

El método manual original de BC, además de ser muy laborioso, implicaba un consumo de tiempo importante y se obtenía productos con un contenido de plaquetas muy variable y limitado [130]. El desarrollo hace una década del equipo OrbiSac por Gambro BCT (actualmente Terumo BCT, Lakewood, CO, EEUU), supuso una mejora significativa en el proceso de producción de BC y reemplazó al sistema de producción manual en muchos centros de transfusión, ayudando a la estandarización y optimización de la producción de pools de BC [131,132]. Más recientemente, Terumo desarrolló el sistema TACSI que ofrece como principal ventaja la preparación simultánea y automatizada de hasta 6 concentrados de plaquetas (CPs). Se sabe que durante su preparación y almacenaje en las condiciones de almacenamiento de los bancos de

sangre, las plaquetas sufren una serie de complejos cambios conocidos como lesión plaquetaria de almacenamiento [116,133]. Diferentes estudios se han dedicado a analizar la calidad de los concentrados de plaquetas obtenidos mediante BC manual o a través de OrbiSac [134–139], mientras disponemos de escasa información sobre los CPs preparados por el dispositivo TACSI [140]. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de utilizar el equipo OrbiSac o TACSI en la calidad *in vitro* de los CPs durante su almacenamiento en condiciones estándar durante un máximo de cinco días.

Material y método

Preparación, almacenamiento y toma de muestras de los CPs

Las unidades de sangre total estándar, obtenidas de donantes sanos, fueron procesadas para separar plasma, concentrados de hematíes y unidades de BC, como se ha descrito anteriormente [139]. El día en el que se realiza la donación de sangre es considerado como día 0, y el fraccionamiento de las unidades donadas se realiza en las primeras 18 horas tras su recolección.

En cada uno de los veinte experimentos realizados en el presente estudio, se mezclaron 10 unidades de plaquetas BC ABO compatibles (recogidas en las 18-20 horas previas por donación de sangre total) y 600 mL de solución aditiva de plaquetas SSP+ (MacoPharma, Mouvoux, France), en un contenedor de gran capacidad (ref.BB*T200BM, Terumo Europa, Leuven Bélgica) utilizando un dispositivo de conexión estéril (TSCDR-II, Terumo Europa). Cada uno de estos 10 pooles primarios (1157.1 ± 10.4 mL; Hematocrito $22.5 \pm 0.7\%$; 874.5 ± 82.2 plaquetas/uL; n=10) se dividió en dos bolsas de transferencia (ref.720433, Laboratorios Grifols S.A, Barcelona, España) con un volumen similar (578.5 ± 5.2 mL) y un contenido celular de aproximadamente 30% de plasma y un 70% de SSP+. Una de las dos bolsas, elegida de manera aleatoria, se conectó de forma estéril a un equipo de procesamiento plaquetario tipo BC Orbisac (Terumo BCT ref.50000), y se procesó para obtener concentrados de plaquetas

leucodepleccionados Orbisac (CPs-O). La segunda bolsa se conectó de forma estéril al Kit TACSI PI (Terumo BCT ref. TF-CSPB3SY02), y se procesó por el equipo TACSI para preparar concentrados de plaquetas leucodepleccionados TACSI (CPs-T). En ambos casos, el procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor, excepto para la adición de SSP+ al concentrado de BC que se realizó de forma manual, como se ha comentado previamente. El almacenamiento de ambos concentrados de plaquetas BC OrbiSac y TACSI fue realizado en envases de PVC de n-butil tri-n-hexil citrato (BTHC).

Después de retirar el exceso de aire y espuma, todos los concentrados de plaquetas (CPs-O y CPs-T) se dejaron reposar durante 1 hora, y fueron posteriormente almacenados durante 7 días bajo condiciones estándar de un banco de sangre, en una incubadora a 22°C y sometidos a una suave agitación (60 ciclos/minutos). En los días 1 (día de preparación de los CPs), 5 y 7 de almacenamiento, se obtuvieron muestras de 10 ml de ambos concentrados de forma aséptica, a través del punto de extracción (OriGen Biomedical, Austin, TX, EEUU) para la realización de los ensayos que se describen a continuación. En el día +7 se realizó a todas las unidades un estudio microbiológico de esterilidad, con un resultado negativo en todas las determinaciones.

Ensayos de recuento y funcionalidad celular

El conteo celular y el volumen plaquetario medio (VPM) se determinaron en todas las muestras de CPs, mediante un contador de partículas electrónico (STKS, Coulter Electronics, Hialeah, FL).

El número de leucocitos remanentes en los CPs leucodepleccionados se contabilizó con un citómetro de flujo usando el Kit Leukocount™ (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Para la realización de los estudios funcionales plaquetarios, se centrifugaron las muestras obtenidas de los CPs (1000 x g, 10 min). El sobrenadante pobre en plaquetas fue extraído para un uso posterior, y el

precipitado plaquetario se resuspendió en un volumen adecuado, para la obtención de alícuotas idénticas de plasma fresco congelado AB con una concentración de plaquetas de 300×10^9 plaquetas/L. Estas fueron almacenadas a -80°C y posteriormente descongeladas a 37°C antes de su uso para los ensayos *in vitro*. La respuesta al choque osmótico (HSR) y los ensayos de agregación plaquetaria en las suspensiones de plaquetas obtenidas de los CPs se realizaron como se ha descrito anteriormente [139]. Para los ensayos de agregación, los agonistas utilizados y la concentración empleada fueron de 1.6 mM ácido araquidónico (AA) (DiaMed, Cressier, Suiza), 25 μM del péptido activador del receptor de trombina (TRAP) (Sigma-Chemical, Madrid, España), 1.25 mg/mL de ristocetina (Sigma-Chemical) y 10 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno (Menarini Diagnostics).

Para el resto de experimentos el sobrenadante pobre en plaquetas obtenido previamente, fue centrifugado de nuevo (1500 x g, 10 min) con el fin de precipitar fragmentos celulares residuales. Cualquier muestra con impureza fue eliminada, y el sobrenadante recuperado (PC-sobrenadante) fue congelado a -80°C hasta la cuantificación de los parámetros metabólicos y marcadores pro-inflamatorios.

El pH en el sobrenadante de los CPs se midió a 22°C usando un pHmetro (M220, Corning Incorporated, Corning, NY, EEUU). Los niveles de bicarbonato y lactato fueron determinados con un analizador de gases sanguíneos ABL 825 (Radiometer, Copenhague, Dinamarca), y los niveles de glucosa se analizaron utilizando una técnica de oxidación de glucosa con un analizador bioquímico Advia 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, EEUU). Finalmente, la concentración de marcadores proinflamatorios de activación plaquetaria, sCD62P (P-selectina soluble), RANTES y sCD40L (ligando CD40 soluble) se midieron en el sobrenadante de los CPs con el set BD™ Cytometric Bead Array (Becton Dickinson), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la realización de los estudios, se utilizó kits específicos para cada marcador: Human soluble P-Selectin (sCD62P) Flex Set, Human sCD154 (sCD40 ligand)

Flex Set, and Human RANTES Flex Set. Las mediciones se realizaron en un citometro de flujo BD FaCScalibur™ (Becton Dickinson) y los resultados de las concentraciones de los marcadores se expresaron como pg/mL.

Análisis estadístico

Las variables continuas se analizaron según el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar si seguían una distribución normal. Los resultados de las diferentes variables medidas en los concentrados plaquetarios se presentan, como media \pm desviación estándar (DE). Se analizaron las diferencias de los test *in vitro* entre los concentrados plaquetario procesados por CPs-O y CPs-T durante el tiempo de almacenamiento, mediante el uso del test de la t-student apareado o de Wilcoxon según se considerará más adecuado. Un valor de $p < 0.05$ se interpretó como una diferencia estadística significativa. Se realizaron estudios de ANOVA unilaterales para mediciones repetidas y test de correlación de Bonferroni para analizar los cambios de las variables durante el almacenamiento para ambos grupos de concentrados de plaquetas (CPs-O y CPs-T). Todos los estudios estadísticos se hicieron con el programa IBM SPSS Statistics versión 15.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago IL).

Resultados

Volumen y contenido celular

En la Tabla 1 se resumen las características generales de los CPs. Como se puede observar, el volumen de los CPs-O fue 30 ml superior al de los CPs-T. Ambos sistemas de procesamiento, OrbiSac y TACSI, consiguieron una recuperación de plaquetas del 80% del contenido de los pooles primarios de BC. Consecuentemente, el contenido total de plaquetas obtenidas en CPs-O y CPs-T fue muy similar, aunque la densidad de plaquetas fue ligeramente superior en los CPs-T (Tabla 1). Resulta interesante el hecho de que el volumen plaquetario

medio (VPM) de los CPs-T es superior al de CPs-O, diferencia que permanece significativa a lo largo del almacenamiento. Finalmente, no hubo diferencias significativas respecto a la concentración de leucocitos contaminantes entre CPs-O y CPs-T (Tabla 1). Las cifras más altas de contaminación fueron de 0.192×10^6 y 0.153×10^6 en CPs-O y CPs-T, respectivamente.

Parámetros metabólicos y estudios funcionales

Se evaluó el comportamiento metabólico de los CPs homólogos obtenidos por buffy coat en plasma SSP+ por medio del sistema OrbiSac (CPs-O) o con TACSI (CPs-T) durante su almacenamiento. Para ello, se midió el pH, la concentración de glucosa, bicarbonato y lactato en los sobrenadantes respectivos de los CPs. Como se muestra en la Tabla 2, el pH permaneció en torno a 7.2 en todos los CPs durante el período de almacenamiento. Como era de esperar, tanto la concentración de glucosa como la de bicarbonato, disminuyó gradualmente a lo largo el período de almacenamiento, mientras que la concentración de lactato sufrió un incremento progresivo hasta alcanzar unos niveles de 12 mM en el día 7. Todos estos parámetros metabólicos experimentaron cambios similares durante el almacenamiento de CPs-O y CPs-T. Sin embargo, se objetivaron leves diferencias, (estadísticamente significativas pero probablemente sin importancia desde el punto de vista científico) entre CPs-T y CPs-O respecto a estos parámetros, sobretodo en el día 1 de la preparación (Tabla 2).

Estudio funcional plaquetario

Se realizaron estudios de HSR y experimentos de agregometría para comparar la respuesta funcional de las plaquetas en los CPs-O y CPs-T durante el almacenamiento. El estudio de HSR demostró que la capacidad de las plaquetas de recuperar su morfología previa, tras ser sometidas a un estrés osmótico, permaneció en niveles aceptables (alrededor del 80%), y fue similar en ambos

métodos CPs-O y CPs-T (Tabla 2). En la Figura 1, se pueden observar los diferentes cambios en la agregación plaquetaria de los CPs. En el día 1, los valores máximos de agregación plaquetaria para cada uno de los 4 agonistas estudiados, fue de alrededor del 70% tanto para CPs-O como CPs-T, y cercano a la respuesta normal de agregación en sujetos sanos para estas dosis de agonista (datos no mostrados). La respuesta de agregación de los CPs disminuyó de forma progresiva a lo largo del almacenamiento, de forma más marcada con los agonistas menos potentes, como el colágeno y el ácido araquidónico. Cabe destacar que no hubo diferencias estadísticas entre CPs-O y CPs-T en la respuesta de la agregación en ninguno de los agonistas durante el período de almacenamiento (Figura 1).

Mediadores de inflamación en el sobrenadante

En la Tabla 3 se resume la evolución de los marcadores de activación o proinflamatorios de los CPs durante el almacenamiento. Es reseñable el hecho de que en el día 1 de la preparación, la concentración de sCD62P, RANTES, y sCD40L fue ligera pero significativamente mayor en los CPs-O que en sus homólogos CPs-T. Como se muestra en la Tabla 3, esta diferencia disminuyó a lo largo del almacenamiento; la concentración de estos marcadores alcanzó niveles similares en ambos tipos de CPs en el día 7.

Discusión

Debido a que la preparación de CPs de BC (CPs-BC) es una tarea laboriosa que requiere múltiples pasos, durante la última década los centros transfusionales han incorporado sistemas semiautomáticos como OrbiSac y TACSI para preparar CPs, incrementando la eficiencia en términos de organización y calidad de los CPs [80,141].

Algunos estudios han demostrado que los CPs preparados con OrbiSac tienen un mayor contenido de plaquetas y una mejor conservación del metabolismo aeróbico de las mismas, en comparación con los CPs preparados manualmente. En contraste, el sistema OrbiSac parece inducir una ligera mayor activación plaquetaria que el procesamiento manual [132,134–136,142]. Este hallazgo se atribuyó a la “mayor tensión de cizalladura” que afecta a las plaquetas durante el procesamiento automático con OrbiSac. Aunque estos resultados podrían provocar cierta preocupación, posiblemente no tienen relevancia clínica [135,136].

Hasta donde sabemos, sólo se había publicado, antes del nuestro, un estudio comparativo de CPs-BC preparados con OrbiSac o TACSI [140]. En ese trabajo, Sandgren y colaboradores compararon CPs homólogos preparados con TACSI, pero almacenadas en dos tipos diferentes de envases de PVC, n-decil ftalato (DnDP) (TACSI R) y BTHC (TACSI T), utilizando CPs no homólogos preparados con OrbiSac como grupo de referencia. Los autores, no encontraron diferencias significativas entre los grupos en cuanto al contenido de plaquetas y VPM, pero sí observaron ligeras diferencias durante el almacenamiento en parámetros metabólicos, funcionales y de activación entre los CPs preparados con TACSI y los obtenidos con OrbiSac [140].

En contraste con el estudio anterior [140], nuestro trabajo fue diseñado para confirmar cualquier diferencia potencial entre CPs-O y CPs-T durante 7 días de almacenamiento independientemente de la fuente de plaquetas. Para ello, se realizaron CPs-BC de alto volumen que posteriormente se dividieron en dos mitades equivalentes, y cada parte se procesó con TACSI u OrbiSac para producir CPs homólogos, los cuales se almacenaron después bajo condiciones estándar de los bancos de sangre. La recuperación plaquetaria (>80%) fue casi idéntica en los dos sistemas, y ambos dispositivos dieron CPs ($>3 \times 10^{11}$ plaquetas, $<10^6$ leucocitos, $\text{pH} \approx 7,2$) que cumplían fácilmente con los estándares europeos para estos productos sanguíneos [118]. Por otra parte, hubo diferencias insignificantes en cuanto a los parámetros metabólicos (pH, consumo de glucosa,

bicarbonato y lactato) y funcionales (HSR, respuesta de agregación) entre los CPs-O y los CPs-T. Todos los parámetros para ambos tipos de CPs mostraron un grado similar de deterioro durante el almacenamiento al que habíamos encontrado previamente en preparados de CPs-BC de forma manual [139].

El hallazgo más notable en este estudio hace referencia a los marcadores de activación y pro-inflamatorios liberados por estos CPs-O y CPs-T, que no habían sido comparados previamente.

La expresión en la superficie plaquetaria de P-selectina (CD62P) es un marcador establecido de activación plaquetaria durante el almacenamiento de CPs [116]. El marcador de activación CD62P soluble es liberado por escisión proteolítica de CD62P, y puede ser un factor de riesgo de tromboembolismo venoso [143,144]. La quimiocina C-C pro-inflamatoria RANTES también es liberada como resultado de la activación plaquetaria durante el procesamiento y almacenamiento de CPs, y la transfusión pasiva de RANTES en CPs podría estar asociada tanto con reacciones inflamatorias como con reacciones de tipo alérgico [145,146]. Respecto a sCD40L, se piensa que deriva principalmente de las plaquetas [147], su acumulación en CPs puede favorecer la aparición de reacciones febriles debido a la inducción de la expresión de ciclooxigenasa-2, y también de lesión pulmonar aguda asociada con la transfusión mediante la activación de los leucocitos polimorfonucleares y daño endotelial [148,149].

Curiosamente, encontramos que los CPs-T contenían niveles significativamente más bajos de sCD62, RANTES y sCD40L en el día de la preparación, aunque esta diferencia desapareció a medida que avanzaba el almacenamiento. Por lo tanto, parece que el procesamiento de CPs-BC con el equipo OrbiSas induce ligeramente una mayor activación plaquetaria que el procesamiento con TACSI, aunque este es un fenómeno transitorio que desaparece durante el almacenamiento. Dado que la mayoría de los CPs son transfundidos antes del día 3 de almacenamiento, al menos en nuestro centro, cantidades reducidas de estos modificadores de respuesta biológica derivados de plaquetas pueden representar una ventaja de CPs-T sobre CPs-O.

Cabe destacar el hallazgo de que los niveles de sCD62P, RANTES y sCD40L en los CPs después de la preparación semiautomática con OrbiSac o TACSI fueron ligera pero significativamente más altos que los recientemente determinados en los CPs de plaquetas obtenidos manualmente [139]. Este hallazgo está en consonancia con los datos de Vetlesen y colaboradores mostrando una mayor activación plaquetaria y acumulación de RANTES en CPs preparados con OrbiSac en comparación con unidades preparadas manualmente [136].

En resumen, nuestra evaluación del procesamiento de plaquetas homólogas con los equipos semiautomáticos TACSI y Orbisac sugiere que, bajo condiciones estándares, los dos métodos de producción de CPs derivados de BC son equivalentes en términos de recuperación celular, preservación de la función plaquetaria y metabolismo *in vitro* durante el almacenamiento. El sistema OrbiSac comparado con TACSI, parece exponer las plaquetas a un mayor estrés mecánico, resultando en concentraciones transitoriamente mayores de sustancias pro-inflamatorias derivadas de plaquetas en los CPs. Dada la amplia experiencia en la transfusión de CPs preparados con OrbiSac, esta diferencia es muy probable que no tenga relevancia clínica.

Agradecimientos

Este proyecto de investigación ha sido financiado por becas de investigación del Instituto de Salud Carlos III (PI10/02594), RECAVA RD12/0042/0050 (ISCIII y FEDER), y Fundación Séneca (07703/GERM/07). ISG tiene una beca de ISCIII (FI10/00535).

Tabla 1: Características de los CPs obtenidos con el Sistema OrbiSac (CPs-O) y TACSI (CPs-T), derivados de pools homólogos de unidades buffy coat ABO idénticas suspendidas en SSP+ (70%) y plasma (30%).

	CPs-O	CPs-T
Volumen (mL)	380.7 ± 6.9	349.9 ± 8.7*
Plaquetas		
(x10 ⁹ /unidad)	351.9 ± 39.9	360.6 ± 33.5
(x10 ⁹ /L)	925.1 ± 109.6	1031.7 ± 104.2*
VPM (fL)	6.65 ± 0.43	6.89 ± 0.40*
Recuperación (%)	80.5 ± 9.8	82.4 ± 6.7
Leucocitos		
(x10 ⁶ /unidad)	0.04 ± 0.05	0.03 ± 0.04

Los valores mostrados son la media ± desviación estándar de las 20 unidades diferentes estudiadas. VPM= volumen plaquetario medio. *P<0.01 frente a CPs-O.

Tabla 2: Evolución durante los 7 días de almacenamiento de los parámetros metabólicos plaquetarios y HSR en los CPs homólogos obtenidos con el sistema OrbiSac (CPs-O) y TACSI (CPs-T), a partir de unidades buffy coat ABO idénticas suspendidas en SSP+ (70%) y plasma (30%).

Parámetros	Día 1		Día 5		Día 7	
	CPs-O	CPs-T	CPs-O	CPs-T	CPs-O	CPs-T
pH	7.20 ± 0.04	7.23 ± 0.05*	7.30 ± 0.07 [#]	7.33 ± 0.07 [#]	7.24 ± 0.10	7.27 ± 0.10*
Glucosa mg/dL	149.6 ± 9.0	154.2 ± 6.51*	102.9 ± 11.5 [#]	101.1 ± 10.0 [#]	76.2 ± 21.3 [#]	70.8 ± 19.5 [#]
Bicarbonato (mM)	7.28 ± 0.53	7.76 ± 0.40*	6.56 ± 0.85 [#]	6.84 ± 1.42 [#]	5.65 ± 1.15 [#]	5.78 ± 0.83 [#]
Lactato (mM)	5.02 ± 0.95	4.62 ± 0.51*	9.71 ± 1.57 [#]	9.34 ± 2.12 [#]	11.35 ± 2.67 [#]	12.06 ± 2.19 [#]
HSR (%)	95.6 ± 11.0	99.7 ± 15.7	86.3 ± 8.7 [#]	88.6 ± 9.6 [#]	87.7 ± 14.2	83.8 ± 10.5 [#]

Los valores mostrados son la media ± desviación estándar de las 20 unidades diferentes estudiadas. HSR= respuesta al choque osmótico. *P<0.01 frente a CPs-O en cada día de almacenamiento, y [#]P<0.05 frente al día 1 en cada tipo de CPs (CPs-O o CPs-T).

Tabla 3: Cambios en el perfil proinflamatorio, durante los 7 días de almacenamiento, en los CPs homólogos obtenidos con el sistema OrbiSac (CPs-O) y TACSI (CPs-T), a partir de unidades buffy coat ABO idénticas suspendidas en SSP+ (70%) y plasma (30%).

Parámetros	Día 1		Día 5		Día 7	
	CPs-O	CPs-T	CPs-O	CPs-T	CPs-O	CPs-T
sCD62 (mg/mL)	28.77 ± 7.88	21.47 ± 6.23*	46.77 ± 7.41 [#]	45.35 ± 4.44 [#]	46.29 ± 8.71 [#]	45.00 ± 4.09 [#]
RANTES (mg/mL)	22.70 ± 12.14	16.63 ± 6.14*	58.87 ± 3.95 [#]	61.80 ± 4.49 ^{*#}	62.49 ± 3.29 [#]	64.04 ± 1.18 [#]
sCD40L (mg/mL)	1.24 ± 0.76	0.63 ± 0.33*	3.70 ± 1.05 [#]	4.24 ± 1.01 ^{*#}	4.18 ± 1.50 [#]	4.61 ± 0.79 [#]

Los valores mostrados son la media ± desviación estándar de las 20 unidades diferentes estudiadas. *P<0.05 frente a CPs-O en cada día de almacenamiento, y [#]P<0.05 frente al día 1 en cada tipo de CPs (CPs-O o CPs-T). RANTES= citoquina quimiotáctica.

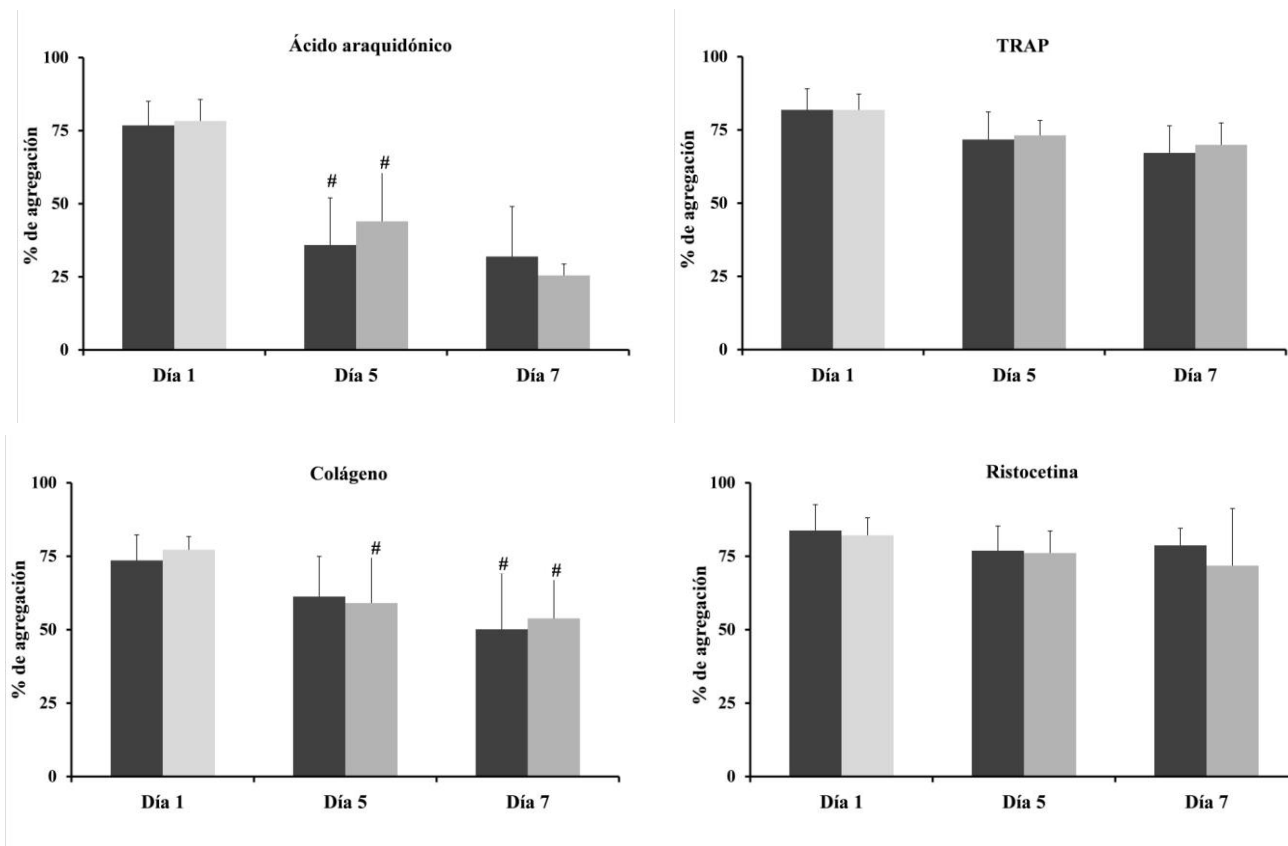


Figura 1: Evaluación de la respuesta de agregación plaquetaria en CPs homólogos obtenidos con el sistema OrbiSac (CPs-O) o TACSI (CPs-T) durante 7 días de almacenamiento. TRAP= péptido activador del receptor de trombina.

***CAPÍTULO II: Estudio comparativo de la
eficacia de las transfusiones profilácticas de
concentrados de plaquetas obtenidas por los
métodos de plasma rico en plaquetas versus
buffy coat, en pacientes sometidos a
trasplante alogénico de progenitores
hematopoyéticos***

6. CAPÍTULO II: Estudio comparativo de la eficacia de las transfusiones profilácticas de concentrados de plaquetas obtenidas por el método de plasma rico en plaquetas o por el método de buffy-coat, en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Resumen

Antecedentes

Los concentrados de plaquetas de sangre total se pueden obtener por el método de plasma rico en plaquetas (CPs-PRP) o por el procedimiento de buffy coat (CPs-BC). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que el fraccionamiento por BC vs. PRP, disminuye la activación plaquetaria, pero hay muy poca información comparativa de la eficacia transfusional de ambos tipos de productos plaquetarios.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar de forma retrospectiva la eficacia de la transfusión de plaquetas en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH) en nuestro centro, antes y después de la implementación de CPs-BC.

Material y métodos

Se revisaron las historias clínicas de 70 transfusiones profilácticas de CPs-PRP y 86 CPs-BC, que se realizaron a un total de 55 pacientes sometidos a TAPH. La eficacia transfusional se evaluó mediante el incremento del recuento corregido a las 24 horas (CCI_{24h}) y los eventos hemorrágicos. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes para evaluar los factores clínicos que potencialmente podían afectar al resultado de la transfusión.

Resultados

Las características clínicas y el número total de transfusiones de plaquetas fue equivalente en el grupo de pacientes transfundidos con CPs-PRP (Grupo CPs-PRP), que en los enfermos que recibieron CPs-BC (Grupo CPs-BC). La exposición media a donantes con cada transfusión individual fue de 5.8 y 5 en los grupos CPs-PRP y CPs-BC, respectivamente ($p < 0.01$). El CCI_{24h} fue significativamente mayor en los pacientes transfundidos con CPs-BC que en los pacientes que recibieron CPs-PRP (8.3[2.7-13.4] frente a 4.7[1.3-8.1]; $p < 0.01$). Los predictores independientes para un menor rendimiento transfusional fueron el diagnóstico diferente al de leucemia aguda (HR 8.30; 95% CI 1.96-35.22; $p = 0.004$), la esplenomegalia (HR 8.75; 95% CI 2.77-27.60; $p = 0.001$), la profilaxis de enfermedad injerto contra huésped diferente de ciclosporina A y metotrexato (HR 3.96; 95% CI 1.55-10.14; $p = 0.004$), y la transfusión de CPs-PRR (HR 4.54; 95% CI 1.72-12.01; $p = 0.002$). No se detectaron diferencias significativas en los eventos hemorrágicos entre ambos grupos.

Conclusiones

En los pacientes sometidos a TAPH, la transfusión de CPs-BC, comparada con la de CPs-PRP, da como resultado un mayor incremento del CCI y una reducción en la exposición a donantes, pero no proporciona un beneficio relevante respecto a los eventos hemorrágicos.

Introducción

Los pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH) experimentan un alto riesgo de complicaciones hemorrágicas secundarias a la trombocitopenia inducida por quimioterapia. Aunque la correcta práctica transfusional después del TAPH sigue siendo controvertida [5], en la práctica clínica la mayoría de las transfusiones de plaquetas se administran de forma profiláctica con el objetivo de aumentar el recuento bajo de plaquetas y reducir el riesgo de sangrado. El ensayo clínico PLADO demostró que la transfusión de plaquetas profilácticas usando bajas dosis podía reducir la cantidad total de plaquetas utilizadas sin incrementar el riesgo de sangrado grado ≥ 2 [23]. Por el contrario, el ensayo clínico TOPPS ha sugerido que la estrategia de transfusiones de plaquetas terapéuticas, es decir transfusiones sólo en el caso de sangrado activo, puede convertirse en el estándar terapéutico aplicable en pacientes seleccionados [29]. En la actualidad existe un gran debate científico acerca del uso de dosis bajas *vs.* alta de plaquetas, o del empleo de transfusiones profilácticas *vs.* terapéuticas, aunque poco se sabe del impacto clínico real del tipo de plaquetas que se transfunden.

Se conoce desde hace bastante tiempo que las plaquetas sufren cambios diversos desde el momento de la extracción de la sangre, y durante el procesamiento y el almacenamiento de los CPs en el banco de sangre. Estos cambios se conocen globalmente como lesión plaquetaria de almacenamiento (LPA) [150]. Estos cambios *ex vivo* en las plaquetas, junto con la situación clínica del paciente pueden afectar al rendimiento transfusional de las plaquetas [151–153]. En la década de los 90, un estudio *in vitro* mostró que los CPs-BC sufren una menor LPA que los CPs-PRP [154]. Melcalfe y colaboradores también encontraron que la activación plaquetaria inducida por el procesamiento fue menor en los CPs-BC que en los CPs-PRP [155]. Hasta el momento, muy pocos estudios han comparado la eficacia y seguridad de la transfusión entre estos dos productos plaquetarios [156–158].

En esta investigación, hemos comparado de forma retrospectiva el resultado de las transfusiones profilácticas de plaquetas con CPs-BC o CPs-PRP en una serie de pacientes sometidos a TAPH.

Paciente, material y métodos

Pacientes del estudio

Se incluyeron en el estudio 55 pacientes sometidos a TAPH entre enero de 2005 y febrero de 2011 en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario Morales Meseguer. Hasta febrero de 2008, los pacientes recibieron transfusiones de CPs-PRP o aféresis de plaquetas. Tras el cambio del tipo de fraccionamiento de CPs en el Centro Regional de Hemodonación, a partir de marzo de 2008, los pacientes sometidos a TAPH recibieron transfusiones de aféresis o CPs-BC.

Este estudio se realizó de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki, y se obtuvo el pertinente permiso del Comité Ético hospitalario. Además se solicitó a los pacientes su consentimiento para la obtención de datos con fines científicos.

Para el objetivo del estudio, los pacientes se clasificaron de forma retrospectiva, en dos grupos en función del tipo de transfusión profiláctica de plaquetas recibida, CPs-PRP o CPs-BC. En ambos grupos los pacientes pudieron recibir unidades de aféresis de plaquetas durante el trasplante, dependiendo de la disponibilidad en el banco de sangre. En esta serie de pacientes sometidos a TAPH, se definió el injerto de plaquetas como: i) el primer día de tres consecutivos en los que el paciente mostró un recuento de plaquetas superior a $20 \times 10^9/L$ siempre que no hubiera recibido una transfusión en el día previo; o ii) el segundo de tres días con cifras de plaquetas superiores a $20 \times 10^9/L$ después de una transfusión de plaquetas. Se consideró que los pacientes alcanzaban un injerto de neutrófilos, el primer día de tres consecutivos con un recuento absoluto de neutrófilos $>0.5 \times 10^9/L$. De acuerdo con los criterios establecidos en nuestra

Unidad Clínica, se administró una transfusión de plaquetas profilácticas si la determinación matutina diaria era inferior a $10 \times 10^9/L$, o inferior a $20 \times 10^9/L$ en determinadas condiciones clínicas, como fiebre o sepsis, según criterio médico.

En este estudio, se excluyeron las transfusiones de plaquetas en función de los siguientes criterios: transfusión terapéutica en el contexto de sangrado grado ≥ 2 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (escala de la OMS); transfusión profiláctica por encima de $20 \times 10^9/L$; múltiples transfusiones de plaquetas en un mismo día; y transfusión de CPs asociado a púrpura trombótica trombocitopénica o síndrome hemolítico-urémico.

El grado de sangrado se determinó en cada paciente tras cada transfusión a partir de la revisión de la historia clínica y fue graduado por dos investigadores independientes de acuerdo a la escala de sangrado utilizada en el estudio PLADO [23], y en caso de discrepancias se resolvió con un tercer investigador.

Preparación de los concentrados de plaquetas

Se obtuvieron unidades de sangre total (450 mL) de donantes habituales, en sistemas de triple bolsa autorizados (Terumo BCT, Zaventem, Belgium; Laboratorios Grifols SA, Barcelona, Spain) con una bolsa primaria que contenía 63 mL de anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa.

Las unidades de plaquetas se obtuvieron mediante fraccionamiento de las unidades de sangre por el método de PRP, previamente descrito [159], y se almacenaron en el banco de sangre bajo condiciones estándares (20-24°C, 60 ciclos/minuto) durante un tiempo máximo de 5 días. Cada concentrado de plaquetas se preparó inmediatamente antes de la transfusión mediante la unión de diferentes unidades de plaquetas ABO idénticas, ajustando al peso total del paciente (10ml/kg). Todos los CPs-PRP se leucodeplecionaron mediante el empleo de un filtro en el momento de la transfusión en la cabecera del paciente.

Del fraccionamiento de sangre total por el método de BC, se obtuvieron unidades transfusionales de CPs-BC leucodeplecionados, en plasma (35%) y solución aditiva plaquetaria (65%) (SSP +, Macopharma-MacoSpania, Madrid, España), como se ha descrito previamente [160]. Los CPs-BC se almacenaron bajo las condiciones descritas arriba, hasta la transfusión durante un periodo máximo de cinco días desde la preparación.

Las unidades de aféresis plaquetarias leucodeplecionadas se obtuvieron directamente de los donantes usando un aparato de aféresis TRIMA o COBE Spectra (Terumo BCT), siguiendo las instrucciones del proveedor. Durante todo el período del estudio, enero de 2005 a febrero de 2011, nuestro procedimiento de obtención de aféresis no sufrió cambios significativos.

Las características generales de cada CPs, así como las propiedades de los productos plaquetarios transfundidos que pudieran afectar a la transfusión de las plaquetas, se obtuvieron de la base de datos del Centro Regional de Hemodonación y/o de la historia médica del paciente, respectivamente, y se resumen en la tabla 1 y 2.

Evaluación de la transfusión de plaquetas

El objetivo principal del estudio fue medir la eficacia de la transfusión mediante el incremento plaquetario post-transfusional (PPI_24h) y el incremento del recuento a las 24 horas (CCI_24h), como se ha descrito previamente [161]. Dado que la cantidad exacta de plaquetas en cada unidad transfundida no estaba disponible, se estimó como la media del contenido de plaquetas el CPs determinado en los controles de calidad rutinarios del Centro Regional de Hemodonación en el momento correspondiente. Se consideró una transfusión eficaz aquella que tuviera un incremento plaquetario corregido a las 24 horas igual o superior a 4500 [157].

Como objetivos secundarios del estudio evaluamos el porcentaje de pacientes con eventos hemorrágicos ≥ 2 según la clasificación de la OMS, la

mortalidad ocasionada por eventos hemorrágicos, el número total de transfusiones de plaquetas, el intervalo entre transfusiones profilácticas y el tiempo desde la primera transfusión hasta el primer evento hemorrágico grado ≥ 2 de la OMS. El seguimiento de los pacientes finalizó cuando se alcanzó un injerto plaquetario ($\geq 20 \times 10^9/L$), en caso de alta hospitalaria, o muerte.

Análisis estadístico

Las variables continuas se analizaron con respecto a su distribución normal, con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables categóricas se presentan como porcentajes y las variables continuas como mediana y rango intercuartílico. Se realizaron análisis con test de chi-cuadrado o Fisher en las variables cualitativas, y T-student, test U y análisis de correlación para variables cuantitativas, para evaluar diferencias en las características de los pacientes y el efecto potencial de las características de los pacientes y/o de los CPs en el CCI_24h. Se analizó si el efecto de las diferentes variables clínicas en la respuesta transfusional plaquetaria era independiente mediante análisis de regresión de COX, incorporando al modelo multivariante solo aquellas variables con un valor de $p < 0.15$ en el análisis univariante. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el análisis estadístico dio un valor de $p < 0.05$. Todos los estudios estadísticos se realizaron con el programa SPSS para Windows Versión 15 (SPSS, Inc., Chicago IL).

Resultados

Características generales de los pacientes

Durante el periodo del estudio, se realizaron 330 transfusiones de plaquetas a 74 pacientes sometidos a TAPH. De estas, se excluyeron 123 transfusiones porque se consideraron transfusiones terapéuticas. Se hicieron 51 transfusiones de plaquetas de aféresis, que se evaluaron separadamente (Tabla 3). Las restantes

156 transfusiones analizadas correspondieron a 70 transfusiones de CPs-PRP en 27 pacientes y 86 de CPs-BC en 28 pacientes.

Las características generales y las características del TAPH de los 55 pacientes analizados se resumen en la Tabla 1. Como se puede observar no hubo diferencias entre ambos grupos de pacientes respecto a las características del paciente, enfermedad o relacionadas con el trasplante. Ambos grupos tuvieron un injerto plaquetario y de neutrófilos similar (Tabla 1). Todos los pacientes recibieron profilaxis del síndrome de obstrucción sinusoidal hepática con heparina a bajo peso molecular a dosis profiláctica, y ningún de ellos desarrolló signos clínicos de dicha complicación. El número de episodios de sepsis fue similar en ambos grupos. Un 12% de los pacientes en el grupo CPs-BC recibió tratamiento con anfotericina B liposomal en el periodo estudiado, mientras que ningún enfermo recibió este tipo de terapia en el grupo CPs-PRP. Cabe destacar que las transfusiones de concentrados de hematíes fueron significativamente menos frecuentes en el grupo de CPs-PRP que en el grupo CPs-BC (mediana de 4 vs. 6, $p=0.025$).

Propiedades de los concentrados de plaquetas y eficacia de la transfusión

El contenido medio de los CPs transfundidos de PRP, antes de la filtración, y de los BC leucodeplecionados fue de $3.90\pm 0.47 \times 10^{11}$ y $3.85\pm 0.18 \times 10^{11}$, respectivamente ($p=0.33$). Los concentrados de BC se almacenaron durante un menor tiempo que los de PRP (3.49 ± 1.13 días vs. 3.93 ± 1.01 días, $p<0.02$). La media del número de donantes de sangre implicados en la preparación de la unidad de plaquetas usada en cada transfusión fue significativamente menor en el caso de CPs-BC que para CPs-PRP (5.01 ± 0.19 vs. 5.76 ± 0.53 donantes, respectivamente; $p<0.01$).

Respecto a las unidades de aféresis transfundidas a los pacientes, durante el periodo de estudio no hubo cambios mayores en la sistemática usada en el CRH para la obtención y el procesado de las plaquetas de aféresis. La media de

plaquetas en estas unidades de aféresis leucodepleccionadas fue de $3.39 \pm 1.16 \times 10^{11}$. El tiempo medio de almacenamiento de las aféresis pre-transfusión, fue similar en los grupo de CPs-PRP y CPs-BC (3.65 ± 1.27 días vs. 3.03 ± 1.17 días, respectivamente; $p=0.08$).

En general, los pacientes de ambos grupos recibieron una mediana de 3 transfusiones de plaquetas durante el período de injerto. A destacar, no hubo diferencias estadísticas en la proporción de unidades de aféresis ni de CPs de sangre total transfundidos entre los grupos (Tabla 2).

Como se muestra en la Tabla 2, tanto el PPI como el CCI fue aproximadamente 2 veces superior en el grupo de CPs-BC que en el de CPs-PRP. Además, el porcentaje de transfusiones ineficaces, ej. CCI_{24h}<4500, fue significativamente menor en los pacientes que recibieron CPs-BC. En contraste, no encontramos diferencias significativas entre las aféresis transfundidas en ambos grupos (Tabla 3). En el análisis del tiempo hasta la siguiente transfusión, tampoco encontramos diferencias entre los dos grupos (Tabla 2).

El análisis univariante identificó como factores asociados con un menor CCI a las 24 horas, el género femenino, la edad mayor de 43 años, la transfusión de CPs-PRP, y algunas características clínicas (Tabla 4). En contraste, en esta serie de transfusiones, la hepatomegalia, la compatibilidad ABO, el tiempo de almacenamiento de los CPs y la superficie corporal del paciente, tuvieron un efecto no significativo en CCI_{24h} (datos no mostrados). En el análisis de regresión multivariante de COX, las variables que permanecieron independientemente asociadas con una pobre respuesta transfusional fueron el diagnóstico diferente al de leucemia aguda (HR 8.30; 95% CI 1.96-35.22; $p=0.004$), la esplenomegalia (HR 8.75; 95% CI 2.77-27.60; $p<0.001$), profilaxis de enfermedad injerto contra huésped (EICH) diferente de ciclosporina A (CsA) y metotrexato (MTX) (HR 3.96; 95% CI 1.55-10.14; $p=0.004$) y la transfusión de CPs-PRP (HR 4.54; 95% CI 1.72-12.01; $p=0.002$) (Tabla 4).

En los análisis secundarios de variables, evaluamos la influencia del tipo de CPs transfundido y su correlación con los eventos hemorrágicos. En este análisis, se incluyeron 25 pacientes del grupo de CPs-PRP y 27 del CPs-BC. Como se muestra en la Tabla 5, un 23% de los pacientes presentaron sangrado grado ≥ 2 , con una mayor incidencia en los pacientes del grupo de CPs-PRP (8[32%] [5 episodios de sangrado grado 2 y 3 grado 3] vs. 4[15%] [3 sangrados grado 2 y 1 grado 4] en el grupo CPs-BC). El sangrado digestivo fue la complicación hemorrágica más frecuente entre los pacientes del grupo CPs-PRP (62.5% de los pacientes), seguido del sangrado urinario, ginecológico y cutáneo (12.5% cada uno de ellos). En contraste, la epistaxis fue el evento hemorrágico más frecuente en el grupo de CPs-BC (50%), seguido del gastrointestinal y del urinario (25% cada uno de ellos). Globalmente, el sangrado cutáneo fue el evento hemorrágico más frecuente (64% de los sangrados grado 1), sin detectarse diferencias entre ambos grupos. Un paciente en el grupo de CPs-BC desarrolló un cuadro de refractariedad inmune a las transfusiones de plaquetas, falleciendo por un sangrado generalizado (intracraneal, hematuria, hemorragia pulmonar, etc.) antes de que se pudiera establecer un protocolo específico de transfusiones de aféresis HLA/HPA compatible.

Finalmente, se observó un intervalo desde la primera transfusión hasta un sangrado grado ≥ 2 , similar en ambos grupos (Tabla 5).

Discusión

Aunque la preparación de CPs de sangre total por el método de BC ha sustituido ampliamente el procedimiento de PRP en todo el mundo, hasta la fecha pocos estudios han comparado el resultado transfusional de CPs-BC y CPs-PRP [129,157,158]. En la actualidad es improbable la realización de un estudio de este tipo, por el abandono de la producción de CPs-PRP en la mayoría de los países desarrollados.

En la década de los 90 “en la era previa a la leucorreducción universal”, Anderson publicó que el uso de CPs-BC frente a CPs-PRP se asociaba con valores de CCI más altos, sin alcanzar diferencias significativas, y con una disminución significativa de las reacciones transfusionales febriles no hemolíticas [129]. Más recientemente, Singh comparó de forma retrospectiva los resultados de la transfusión de concentrados de plaquetas de BC, PRP y de unidades de aféresis, sin observar diferencias ni en el CCI ni en la recuperación plaquetaria entre los diferentes productos. Potenciales sesgos de este estudio fueron la heterogeneidad de la muestra y la separación poco clara entre las transfusiones de plaquetas profilácticas o terapéuticas [158].

Un hallazgo importante en nuestro estudio retrospectivo es un porcentaje significativamente mayor de transfusiones eficaces (es decir, $CCI_{24h} > 4500$) usando CPs-BC que al transfundir CPs-PRP (70% vs. 53%), siendo corroborado este resultado en el análisis multivariante. Dado que nuestra política de transfusión y manejo de trasplante no se modificó significativamente durante el estudio, es improbable que estos factores hayan tenido una influencia significativa sobre la eficacia de la transfusión. Por otra parte, también es improbable que el beneficio de la transfusión asociado con CPs-BC se deba a grandes diferencias en las características de los pacientes en el tiempo (2005-2007 vs. 2008-2011), dado que la eficacia de las transfusiones de aféresis fue similar entre los grupos de CPs-BC y CPs-PRP.

Otras variables identificadas en el análisis multivariante asociadas de forma independiente con una mayor eficacia transfusional fueron la ausencia de esplenomegalia, la profilaxis de EICH con CsA-MTX y el diagnóstico de LA.

Nuestros hallazgos están en consonancia con estudios previos que demuestran que la esplenomegalia reduce los incrementos plaquetarios post-transfusionales en pacientes oncohematológicos [152,162]. También se ha demostrado que la profilaxis de EICH puede influir en la eficacia de la transfusión. Así, Besinguer describió que los pacientes que reciben MTX solo para la profilaxis EICH requirieron de forma significativa más unidades de

plaquetas que los que reciben CsA o CsA-MTX [163]. Además, Ishida demostró en una serie de pacientes sometidos a TAPH que los niveles séricos elevados de tacrolimus o CsA se asociaron de forma significativa con una peor respuesta transfusional [164]. En contraste con nuestro resultado, un estudio previo ha demostrado una influencia insignificante del diagnóstico de LA en el CCI, pero esta investigación no se limitó a las transfusiones profilácticas como en el presente estudio [162].

En las dos últimas décadas, los eventos hemorrágicos han desplazado a los datos analíticas como las variables principales en los estudios de transfusión de productos plaquetarios. En línea con el estudio de Rebullá y colaboradores [11], el evento hemorrágico leve más común observado en nuestro estudio fue el sangrado cutáneo, mientras que el sangrado gastrointestinal fue la complicación hemorrágica grado ≥ 2 de la OMS más frecuente. En general, la tasa de sangrado en nuestro estudio fue baja (15-32%). Cabe mencionar que los diferentes ensayos clínicos se han mostrado una alta variabilidad en la tasa de hemorragia (10-70%) [11,23,29], que puede explicarse por la forma en que los investigadores han evaluado y clasificado los episodios hemorrágicos [30]. Mientras que, como se indicó anteriormente, la transfusión de CPs-BC favorece un mayor incremento de plaquetas, es reseñable que este incremento no se asoció con una mejoría de las variables clínicas, como el tiempo hasta la siguiente transfusión, el número total de eventos hemorrágicos o el tiempo desde la primera transfusión hasta la aparición de un evento hemorrágico grado ≥ 2 de la OMS. En consonancia con nuestros resultados, un análisis secundario de estudio PLADO demostró que la transfusión de plaquetas de aféresis, ABO-plaquetas idénticas o plaquetas almacenadas ≤ 3 días, tuvieron un mayor incremento del recuento de plaquetas, pero estos resultados no se correlacionaron con un efecto significativo en el tiempo desde la primera transfusión hasta la aparición de un evento hemorrágico grado ≥ 2 [153].

Un hallazgo inesperado de nuestro estudio, fue un mayor número de transfusiones de concentrados de hematíes en el grupo de CPs-BC, a pesar de que

estos pacientes tuvieron menos complicaciones hemorrágicas. El subanálisis del estudio TOPPs de los pacientes que recibieron quimioterapia o TAPH, muestra que los pacientes que recibieron transfusiones profilácticas tuvieron un menor número de eventos hemorrágicos en comparación con el grupo que sólo recibió transfusiones terapéuticas. No obstante, estos resultados no se asociaron con una disminución significativa de la transfusión de concentrados de hematíes [165]. Estos resultados nos sugieren que múltiples variables están involucradas en los requerimientos transfusionales de concentrados de hematíes durante un TAPH [166]. Por lo tanto, estudios adicionales que quedan fuera del objetivo de este estudio, son necesarios para analizar el papel de la transfusión de plaquetas en los requerimientos de concentrados de hematíes y los eventos hemorrágicos.

Un beneficio adicional observado en este estudio fue la reducción en la exposición a diferentes donantes con cada transfusión de CPs-BC (5 donantes frente a 6 en el grupo CPs-PRP) durante el período de injerto. Esta reducción pequeña pero significativa, puede proporcionar protección adicional a los pacientes respecto a procesos infecciosos y potencialmente frente a fenómenos de aloinmunización. Una estimación real de tal beneficio potencial requeriría un ensayo clínico aleatorizado que sería problemático realizar hoy en día. Es reseñable que el estudio TRAP no demostró diferencias en la tasa de aloinmunización entre unidades de aféresis leucoreducidas y concentrados de plaquetas leucoreducidos [152]. Aunque un metaanálisis posterior de los estudios realizados concluyó que no es posible establecer diferencias con los estudios actuales, respecto a inmunización y refractariedad entre los diferentes productos plaquetarios [157].

Debemos reconocer algunas limitaciones en nuestro estudio. En primer lugar, se trata de un estudio retrospectivo y el análisis de los datos se basa en las historias clínicas. En segundo lugar, la mayoría de los pacientes en ambos grupos CPs-BC y CPs-PPR recibieron esporádicamente plaquetas de aféresis, cuando la transfusión era necesaria y no se disponía de CPs de sangre total. Sin embargo, el número de transfusiones de aféresis en ambos grupos fue similar. En tercer lugar,

aunque nuestros criterios de transfusión y manejo del paciente sometido a TAPH fueron similares a lo largo de todo el período de estudio (2005-2011), algunas variables como la administración de anfotericina B liposomal fue mayor en el período de transfusión de CPs-BC. Dado que se ha descrito que el uso de este fármaco tiene un efecto negativo en el CCI [167], consideramos improbable que este factor haya influenciado la aparente ventaja de los CPs-BC en términos de eficacia transfusional que hemos visto en nuestro estudio. Por último, la imposibilidad de confirmar que todas las reacciones transfusionales hayan sido sistemáticamente documentadas en los registros clínicos, nos impidió la realización de un análisis comparativo de estos eventos entre los dos grupos de pacientes.

Conclusiones

En resumen, este estudio retrospectivo muestra que la transfusión de CPs-BC, en comparación con la transfusión de CPs-PRP, favorece mayores incrementos del recuento plaquetario post-transfusional y reduce de forma moderada, pero significativamente, la exposición de donantes por cada episodio de transfusión de CPs derivados de sangre total. Sin embargo, el uso de CPs-BC es equivalente al de CPs-PRP en la prevención de complicaciones hemorrágicas mayores en pacientes sometidos a TAPH. Además se confirma que condiciones clínicas del paciente, como el tipo de enfermedad, la esplenomegalia y la profilaxis de EICH utilizada, desempeñan un papel importante en el resultado de la transfusión y deben considerarse al estimar el riesgo de hemorragia del paciente, independientemente del producto plaquetario que se transfunda.

Agradecimientos

Agradecemos a nuestros compañeros clínicos y de laboratorio del Servicio de Hematología y Oncología Médica, del Hospital Universitario Morales

Meseguer y del Centro Regional de Hemodonación, por su ayuda en la realización del estudio.

Este proyecto de investigación ha sido financiado por becas de investigación del Instituto de Salud Carlos III (PI17/01311, CB15/00055) y la Fundación Séneca (19873/GERM/15).

Tabla 1. Características basales y del TAPH.

Características	CPs-PRP	CPs-BC	Valor P
Pacientes	27	28	
Edad – años	44 (26-55)	37.5 (27.5–52.5)	0.7
Sexo femenino	11 (41)	8 (29)	0.34
Superficie corporal – m²	1.75 (1.64-1.88)	1.85 (1.67–1.99)	0.17
Esplenomegalia	4 (15)	7 (25)	0.34
Hepatomegalia	3 (11)	5 (18)	0.48
Diagnóstico			0.28
LA	13 (48)	12 (43)	
SMD	2 (7)	2 (7)	
SLP	4 (15)	9 (32)	
DCP	2 (7)	4 (14)	
SMP	5 (19)	1 (4)	
Otros	1 (4)	0 (0)	
Situación de la enfermedad en el trasplante			0.17
RC 1	8 (30)	7 (25)	
RC 2	5 (18)	9 (32)	
RP	4 (15)	8 (29)	
Otras	10 (37)	4 (14)	
Líneas de quimioterapia previas	2 (1 – 3)	3 (2 - 4)	0.082

Los valores mostrados son la mediana \pm rango intercuartílico o el valor absoluto y el porcentaje. CPs-BC= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de buffy coat; CPs-PRP= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de plasma rico en plaquetas; DCP= discrasia de células plasmáticas; LA= leucemia aguda; RC= respuesta completa; RP= respuesta parcial; SLP= síndrome linfoproliferativo; SMD= síndrome mielodisplásico; SMP= síndrome mieloproliferativo; TAPH= trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. #P<0.05 respecto al grupo de CPs-BC.

Tabla 1. Características basales y del TAPH (continuación).

Características	CPs-PRP	CPs-BC	Valor P
Pacientes	27	28	
HLA no idéntico	4 (15)	4 (14)	0.95
Donante no emparentado	7 (26)	9 (32)	0.61
Fuente de progenitores hematopoyéticos			0.36
Médula ósea	4 (15)	2 (7)	
Sangre periférica	23 (85)	26 (93)	
Compatibilidad ABO			0.84
Idéntica	15 (56)	15 (54)	
Incompatibilidad mayor o bidireccional	8 (34)	10 (35)	
Incompatibilidad menor	4 (15)	3 (11)	
Régimen de acondicionamiento			0.67
Mieloablativo	11 (41)	13 (46)	
Intensidad reducida	16 (59)	15 (54)	
Profilaxis EICH			0.051
CsA + MTX	17 (63)	18 (64)	
CsA + MMF	7 (26)	1 (4)	
CsA + MTX + ATG	3 (11)	8 (28)	
Otra	0	1 (4)	
Transfusión de concentrados de hematíes	4 (2 - 6)	6 (2-10.75)	0.025 [#]
Día de injerto de neutrófilos			
>0.5x10⁹/L	18 (16-20)	19 (16-23)	0.09
>1x10⁹/L	19 (16.3- 22.8)	21 (17-27.5)	0.09
Día de injerto de plaquetas			
>20x10⁹/L	12 (11-13)	13.5 (11.3-20.5)	0.1
>50x10⁹/L	14 (13-17)	15 (12.8-20.3)	0.22

Los valores mostrados son la mediana ± rango intercuartílico o el valor absoluto y el porcentaje. ATG= globulina antitimocito; CPs-BC= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de buffy coat; CPs-PRP= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de plasma rico en plaquetas; CsA= ciclosporina A; EICH= enfermedad injerto contra huésped; HLA= antígenos leucocitarios humanos; MMF= mofetil micofenolato; MTX= methotrexato. TAPH= trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. [#]P<0.05 respecto al grupo de CPs-BC.

Tabla 2. Análisis de la transfusión de plaquetas y de la eficacia de las transfusiones de CPs obtenidos de sangre total en ambos grupos.

Parámetros	CPs-PRP	CPs-BC	Valor P
	N=27	N=28	
Transfusiones de plaquetas totales	90	117	
Tipo de plaquetas			
CPs-ST	70 (78)	86 (73.5)	0.27
Aféresis	20 (22)	31 (26.5)	
Transfusiones de plaquetas por pacientes	2 (2-4)	3 (1.3-6.8)	0.44
Análisis de la eficacia de CPs-ST			
Nivel plaquetario pre-transfusional (x10⁹/L)	13 (11 – 16)	14 (11 – 17)	0.35
Nivel plaquetario post-transfusional tras 24h (x10⁹/L)	22.5 (16.8 – 32)	31.5 (21 – 42)	0.024*
PPI_24h (x10⁹/L)	9 (3 – 19)	18 (7 -26.3)	0.032
CCI_24h (x10⁹/L)	4.75 (1.2 – 8.4)	8.7 (3 -13.5)	<0.01*
CCI_24 h > 4500 - % de las transfusiones	37 (53)	60 (70)	<0.05*
Días hasta la siguiente transfusión	1.9 (1 – 3)	2 (1.5 – 3)	0.6

Los valores mostrados son la mediana ± rango intercuartílico o el valor absoluto y el porcentaje. CCI= incrementos del recuento corregido; CPs-BC= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de buffy coat; CPs-PRP= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de plasma rico en plaquetas; CPs-ST= concentrado de plaquetas derivados de sangre total; PPI= Incremento plaquetario post-transfusional. *P<0,05 respecto al grupo de CPs-PRP.

Tabla 3. Análisis de la eficacia de las aféresis transfundidas en ambos grupos.

Parámetros	CPs-PRP	CPs-BC	Valor P
Número de transfusiones de unidades de aféresis	20	31	0.27
Contaje plaquetario pre-transfusional ($\times 10^9/L$)	13 (11 – 16)	14.7 (12 – 17)	0.08
Contaje plaquetario post-transfusional tras 24h ($\times 10^9/L$)	20.5 (15.2 – 32)	27 (20 – 32)	0.12
PPI_ 24h ($\times 10^9/L$)	9 (3.3 – 16.5)	12 (3 -20)	0.35
CCI_24h ($\times 10^9/L$)	4.6 (1.7 – 8)	6.3 (1.8 -9.5)	0.34
CCI_24 h > 4500 - % de las transfusiones	10 (50)	19 (61)	0.43

Los valores mostrados son la mediana \pm rango intercuartílico o el valor absoluto y el porcentaje. CCI= incrementos del recuento corregido; CPs-BC= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de buffy coat; CPs-PRP= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de plasma rico en plaquetas. PPI= Incremento plaquetario post-transfusional.

Tabla 4. Factores asociados con una pobre repuesta a la transfusión de plaquetas

	Análisis univariante HR (95% CI); p	Análisis multivariante HR (95% CI); p
<i>Relacionados con el paciente</i>		
Sexo femenino	3.78 (1.91-7.49); p<0.001	1.90 (0.68-5.23); p=0.216
Edad >43 años	1.03 (1.01-1.06); p=0.003	1.03 (0.99-1.06); p=0.143
Esplenomegalia	4.32 (1.90-9.84); p<0.001	8.75 (2.77-27.60); p<0.001*
Diagnóstico[#]	13.67 (4.00-46.73); p<0.001	8.30 (1.96-35.22); p=0.004*
Fuente de PH (MO)	2.91 (1.24-6.81); p=0.014	1.45 (0.40-5.41); p=0.577
Acondicionamiento (RIR)	5.21 (2.37-11.46); p<0.001	2.15 (0.62-7.50); p=0.230
Profilaxis EICH[^]	2.64 (1.34-5.20); p=0.005	3.96 (1.55-10.14); p=0.004*
Mucositis grado ≤2	2.21 (0.92-5.30); p=0.075	2.63 (0.68-10.27); p=0.163
<i>Relacionados con el producto</i>		
Transfusión CPs-PRP	2.06 (1.07-3.97); p=0.031	4.54 (1.72-12.01); p=0.002*

Acondicionamiento (RIR)= régimen quimioterápico de intensidad reducida; CPs-PRP= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de plasma rico en plaquetas; Diagnóstico[#]= diagnóstico diferente a LA; Fuente de PH (MO)= médula ósea como fuente de progenitores hematopoyéticos de; Profilaxis EICH[^]= profilaxis de enfermedad injerto contra huésped, diferente a CsA-MTX. HR= hazard ratio; CI = intervalo de confianza. *P<0.05 respecto al grupo de CPs-PRP.

Tabla 5. Evaluación de las complicaciones hemorrágicas en ambos grupos

Características	CPs-PRP	CPs-BC	Valor P
Número de pacientes	25	27	
Eventos hemorrágicos			0.14
Grado 0-1	17 (68)	23 (85)	
Grado ≥ 2	8 (32)	4 (15)	
Días	5.6 (3.6 – 8.1)	6.7 (2.5 – 12.5)	0.6
Muertes por hemorragia	0	1	

Los valores mostrados son la mediana \pm rango intercuartílico o el valor absoluto y el porcentaje. CPs-BC= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de buffy coat; CPs-PRP= concentrados de plaquetas obtenidos por el método de plasma rico en plaquetas; Días= días desde la primera transfusión de concentrados de plaquetas hasta un evento hemorrágico grado ≥ 2 .

***CAPÍTULO III: Evaluación de la calidad y
eficacia transfusional de los concentrados de
plaquetas lavados con solución aditiva
Composol® obtenidos por el método de
buffy coat***

7. CAPÍTULO III: Evaluación de la calidad y eficacia transfusional de los concentrados de plaquetas lavados con solución aditiva Composol® obtenidos por el método de buffy-coat

Resumen

Antecedentes

La transfusión de concentrados de plaquetas lavados (CPs-LAV) se recomienda en determinados pacientes, como los que tienen un antecedente de reacción transfusional alérgica grave. No obstante, no existe una metodología estandarizada para la preparación de estos productos en la actualidad.

En este trabajo, hemos analizado el efecto de un procedimiento de lavado manual en la calidad de las plaquetas *in vitro* y en la eficacia transfusional de los CPs-LAV.

Diseño y métodos

Para la realización del estudio, se prepararon CPs-LAV con solución aditiva Composol® obtenidos mediante el método de buffy coat con un solo proceso de centrifugación. La activación y función plaquetaria se evaluó antes y después del proceso de lavado, con los siguientes ensayos: a) expresión de CD62 determinada por citometría de flujo; b) agregación plaquetaria (LTA); y c) test VerifyNow® P2Y12. Se realizó un estudio prospectivo transfusional en 11 pacientes diagnosticados de enfermedades oncohematológicas que recibieron, en un intervalo corto de tiempo, dos transfusiones consecutivas: una transfusión de CPs estándar (CPs-EST) y otra de CPs-LAV. Se analizó la eficacia transfusional analizando el incremento plaquetario post-transfusional, el incremento

plaquetario corregido a la hora y 24 horas de la transfusión y la aparición de eventos hemorrágicos.

Resultados

La recuperación de plaquetas en los CPs-LAV tras el proceso de centrifugación fue del $84.8 \pm 5.4\%$. El proceso de lavado aumento discretamente los parámetros de activación en los CPs-LAV respecto a las muestras prelavado (% CD62+ plaquetas 23.6 ± 7 vs 14.8 ± 1 ; $p=0.03$). En comparación con las muestras prelavado, la reactividad plaquetaria determinada con el test VerifyNow P2Y12 fue significativamente menor con adenosina difosfato (ADP) (PRU 32.2 ± 37.7 vs. 4.2 ± 2.4 , $p=0.027$), pero similar con el uso de iso-TRAP. La agregación plaquetaria tras el estímulo con TRAP, colágeno, ristocetina y ácido araquidónico se mantuvo en los CPs-LAV. En el estudio piloto transfusional se objetivaron unos incrementos plaquetarios corregidos similares tanto en el análisis a la hora (13.5 ± 5.6 vs. 11.5 ± 7.3 , $p=0.49$) como a las 24 horas (11 ± 7.2 vs. 9 ± 6.5 , $p=0.48$) en los CPs-EST y CPs-LAV, respectivamente. La transfusión de CPs-LAV no se asoció con un incremento de eventos hemorrágicos.

Conclusiones

En este estudio, hemos establecido un método sencillo para obtener CPs-LAV mediante el método de buffy coat, ocasionando mínimos efectos en la calidad de las plaquetas *in vitro* y manteniendo una adecuada eficacia transfusional. Este procedimiento puede ser implementado de forma sencilla en los centros de transfusión para la preparación bajo demanda de plaquetas lavadas.

Introducción

Las reacciones transfusionales alérgicas (RTA) son las reacciones adversas no hemolíticas más frecuentes de los componentes sanguíneos, con una incidencia que varía del 0,15% para el plasma y concentrados de hematíes hasta un 5% en las transfusiones de plaquetas [7,67]. Aunque la fisiopatología de las RTA sigue sin estar totalmente aclarada, proteínas plasmáticas como la inmunoglobulina A (IgA) o haptoglobina (Hp), alérgenos alimentarios y citoquinas inflamatorias y quimiocinas, que se acumulan en los productos sanguíneos durante el almacenamiento, son consideradas como los principales mediadores de las reacciones transfusionales [7]. Aunque las RTA raramente son graves, es imprescindible su prevención, para evitar un sufrimiento innecesario a los pacientes. A menudo, antes de la transfusión de plaquetas, se administran antihistamínicos para prevenir las RTA, a pesar de que no existe una evidencia científica que respalde esta práctica terapéutica [7,39]. Por otra parte, sí se ha demostrado que tanto la reducción de plasma como el lavado de las plaquetas disminuyen hasta 10 veces la frecuencia de RTA en pacientes que precisan transfusiones de plaquetas [39,66,67]. Por lo tanto, estas técnicas de banco de sangre podrían ser el nuevo estándar en todos los pacientes o, al menos, en aquellos casos con episodios recurrentes de RTA.

En esencia, el lavado de plaquetas es un proceso que tiene como objetivo el reemplazo del plasma del donante por suero salino o solución aditiva de plaquetas. Desafortunadamente, el proceso de lavado implica un elevado consumo de tiempo, la necesidad de un personal cualificado y a su vez, su uso generalizado está limitado por la falta de un estándar de calidad internacional [31, 56].

El objetivo de nuestro estudio es validar un protocolo sencillo de lavado de CPs con solución aditiva obtenidos por el método de buffy coat. Para ello, se ha evaluado el efecto del procedimiento de lavado en la activación y función *in vitro*, y se ha comparado con el resultado de la transfusión de CPs estándar y

lavados en una cohorte de pacientes que han recibido dos transfusiones de plaquetas en un corto intervalo de tiempo.

Material y métodos

Preparación y lavado de los concentrados de plaquetas

Los CPs leucodepleccionados se prepararon combinando 5 unidades de plaquetas buffy coat ABO idénticas mezcladas con 300 mL de solución aditiva Composol® (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg Alemania), usando el sistema OrbiSac (Terumo BCT Europe N.V, Zaventem, Belgica), como se ha detallado previamente [139]. Después de la preparación, estos CPs se dejaron reposar durante 1 hora, y luego se almacenaron en una incubadora estándar de CPs (Helmer Inc, Noblesville, IN, EE.UU.) a 22°C, sometidos a una suave agitación (60 ciclos/minutos) hasta su uso en los siguientes 5 días.

El grupo control del estudio incluyó 11 CPs procesados de forma estándar (CPs-EST), que se almacenaron en una incubadora a 22°C con una agitación continua y suave, y que fueron distribuidos para su transfusión a pacientes seleccionados dentro de los 5 días tras su preparación (tiempo de almacenamiento medio 2.64 ± 1.36 días). En el día de la transfusión, se obtuvo de forma estéril una muestra de los CPs para la realización de los estudios *in vitro*, como se describe a continuación. El grupo de investigación del estudio incluyó otros 11 CPs con un tiempo de almacenamiento similar al del brazo control (2.36 ± 0.66 días), pero que en el día de la transfusión se sometieron a un procedimiento de lavado para obtener los CPs-LAV. Brevemente, 300 ml de solución aditiva plaquetaria CompoSol® fueron transferidos a los CPs, usando para ello un conector estéril (TSCD®-II, Terumo BCT Europa). La bolsa vacía de la solución aditiva CompoSol® se sustituyó por una bolsa de transferencia (2L Bag BB*J200BM, Terumo BCT Europa), usando de nuevo el conector TSCD®-II, y la bolsa de transferencia sellada con el CPs se centrifugó a $1800 \times g$ durante 9 minutos, a 22°C en una centrífuga Sorvall™ RC-3BP (Thermo Fisher

Scientific Inc. Waltham, MA EEUU). Posteriormente, el sobrenadante de los CPs fue cuidadosamente transferido a otra bolsa de transferencia usando una prensa manual añadiendo finalmente otros 300 ml de solución aditiva Composol®, tras una unión estéril con el conector TSCD®-II. Al finalizar el traspaso de la solución aditiva de Composol®, la bolsa vacía se retiró utilizando un aparato de sellado térmico (T-SEAL II, Terumo BCT Europa). El CPs-LAV resultante se dejó reposar durante 45 minutos y se almacenó durante al menos 1 hora en una incubadora de CPs sometidos a una suave agitación (60 ciclos/min) para conseguir una adecuada resuspensión plaquetaria.

En el grupo de CPs-LAV se obtuvo una muestra antes y después del procedimiento de lavado para su evaluación *in vitro*, como se describe posteriormente. En 2 de los 11 CPs-LAV, se determinó el contenido proteico en el sobrenadante de los CPs antes y después del procedimiento de lavado en un analizador automático (Cobas 701, Roche España, Barcelona, España), objetivando una reducción del 90% de los niveles de proteína (0.3 vs. 2.7 mg/dL antes del lavado).

Ensayos de laboratorio

Se realizaron diferentes estudios *in vitro* en las 22 muestras de los CPs incluidos en el estudio. En los 11 CPs del grupo de investigación, los estudios se hicieron antes y después del lavado. Los recuentos celulares se determinaron mediante un contador electrónico (STKS, Coulter Electronics, Hialeah, FL).

Para la realización de los estudios funcionales plaquetarios se obtuvieron 5 ml de muestras de los CPs de forma aséptica, y se centrifugaron (1000 x g, 10 minutos) para eliminar el sobrenadante pobre en plaquetas. El precipitado plaquetario se resuspendió suavemente en un volumen apropiado de plasma fresco congelado AB, con el fin de ajustar el recuento de plaquetas a 300×10^9 plaquetas/L. En el estudio se utilizó un único lote de plasma fresco congelado de

AB, previamente almacenado a -80°C , y que fue descongelado a 37°C inmediatamente antes de su uso.

Se realizaron ensayos de agregación de plaquetas y evaluación de la activación plaquetaria por citometría de flujo (P-Selectina [CD62P]) en las suspensiones de plaquetas obtenidas de los CPs, como se ha descrito anteriormente [139]. Los agonistas utilizados y la concentración empleada fueron: 1.6 mM ácido araquidónico (AA) (DiaMed, Cressier, Suiza), 25 μM de péptido activador del receptor de trombina (TRAP) (Sigma-Chemical, Madrid, España), 1.25 mg/mL de ristocetina (Sigma-Chemical) y 10 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno (Menarini Diagnostics, Barcelona, España).

La agregación plaquetaria también se determinó por el método VerifyNow® (Accumetrics, San Diego, CA). Para realizar este estudio, la sangre fue reconstituida *in vitro* utilizando plaquetas obtenidas de muestras pre y post-lavado junto a plasma AB y hematíes del grupo O. Estas muestras fueron añadidas a los cartuchos P2Y₁₂ para evaluar la agregación plaquetaria siguiendo las instrucciones del proveedor [168].

Estudios in vivo

Realizamos un estudio transfusional prospectivo en nuestra Unidad Clínica del Hospital Universitario Morales Meseguer. El estudio incluyó a 11 pacientes con trombocitopenia inducida por quimioterapia o secundaria a una enfermedad hematológica, en los que se estimó *a priori* la necesidad de recibir dos transfusiones de plaquetas en un intervalo corto de tiempo. El orden del tipo de transfusión de plaquetas recibida, primero CPs-LAV y segundo CPs-EST o viceversa, dependió de la disponibilidad de CPs-LAV en el Centro Regional de Hemodonación. El objetivo primario del estudio fue medir la eficacia de transfusión mediante el incremento plaquetario post-transfusional y el incremento del recuento corregido (CCI) a 1 hora y 24 horas de la transfusión. Estos parámetros fueron calculados antes de la siguiente transfusión. De acuerdo

a la literatura actual, se consideró una transfusión eficaz aquella que obtuviera un incremento plaquetario corregido a 1 hora y 24 horas igual o superior a $7.5 \times 10^9/L$ y $4.5 \times 10^9/L$ respectivamente [157,161]. Un objetivo secundario del estudio fue medir los eventos hemorrágicos según la escala de OMS [152]. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes y se evaluaron los factores clínicos que pudieran afectar a la eficacia de la transfusión, como la fiebre, sepsis, mucositis o cualquier toxicidad clínica, según los criterios de la OMS [169].

Este estudio se realizó de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki, y fue aprobado por el Comité Ético hospitalario. Los pacientes incluidos en el estudio dieron su consentimiento informado para la obtención de datos con fines científicos.

Análisis estadístico

Los resultados de las diferentes variables medidas en los CPs se muestran, como media \pm desviación estándar (DE) o porcentaje, según corresponda. Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución normal de las variables continuas. Las diferencias de los test *in vitro* entre los concentrados plaquetarios antes y después del lavado, y los cambios en la eficacia transfusional entre CPs-EST y CPs-LAV se analizaron mediante el uso del test de la t-student apareado. Las características clínicas de los pacientes en el momento de la primera y segunda transfusión se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Se consideró una diferencia estadística significativa una $p < 0.05$. Todos los estudios estadísticos se realizaron con el programa SPSS para Windows Versión 15 (SPSS, Inc., Chicago IL).

Resultados

Efectos del lavado en la recuperación y en la funcionalidad/función plaquetaria

Las características generales de los CPs se resumen en la Tabla 1. Como se muestra, no hubo diferencias entre los diversos parámetros analizados entre los CPs-EST y los CPs-LAV antes del procedimiento, lo que sugiere la ausencia de sesgos en la selección de los CPs-EST seleccionados para realizar el lavado. Como se muestra, el procedimiento de lavado condujo a una pérdida moderada, pero significativa de plaquetas, proporcionando una recuperación de aproximadamente el 85% del contenido inicial, en un volumen similar.

En nuestras condiciones experimentales, el lavado provocó un leve pero significativo incremento en el grado de activación de las plaquetas, evaluado mediante la expresión de P-selectina en plaquetas en situación basal. Además, las plaquetas lavadas mostraron una capacidad ligeramente inferior para liberar P-selectina de los gránulos α tras la estimulación con TRAP (Tabla 1).

La agregometría de transmisión lumínica, prueba de referencia para el estudio de la función plaquetaria [170], mostró que el procedimiento de lavado tenía efectos insignificantes sobre la capacidad funcional de los CPs. De hecho, para todos los agonistas estudiados, las plaquetas lavadas mostraron una respuesta de agregación máxima que era similar o incluso ligeramente superior respecto a las del grupo control. Por el contrario, en los ensayos de agregación con la prueba VerifyNow® se observó que la agregación plaquetaria inducida con un agonista débil como ADP, se deterioró significativamente, pero no tras la estimulación con iso-TRAP después del proceso de lavado (Tabla 1).

Efecto del proceso de lavado en la eficacia transfusional

La eficacia transfusional de los CPs obtenidos con nuestro sencillo procedimiento de lavado se evaluó en una pequeña cohorte de 11 pacientes oncohematológicos (9 hombres y 2 mujeres), que recibieron dos transfusiones de plaquetas en un corto periodo de tiempo. Dos pacientes estaban en tratamiento quimioterápico de inducción por una leucemia aguda mieloblástica (paciente 1 y 2), y otro por una leucemia mieloide aguda tras una trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (paciente 3), cuatro pacientes habían recibido un trasplante autólogo (paciente 4-7), tres pacientes un trasplante alogénico (paciente 8-10) y un paciente estaba diagnosticado de un síndrome mielodisplásico con trombopenia grave (paciente 11). La mediana de edad de esta serie de pacientes fue de 58 (49-63) años y su superficie corporal fue de 1,88 (1,6-2,2) m².

En 10 de los 11 pacientes incluidos, la primera transfusión recibida fue de un CPs-LAV, recibiendo en segundo lugar un CPs-EST. El intervalo medio entre la primera y segunda transfusión fue de $3,2 \pm 1,9$ días. Como se resume en la Tabla 2, la revisión de los datos clínicos demostró que la situación de los pacientes antes de la primera y segunda transfusión era similar respecto a variables que pudieran influir en la eficacia de la transfusión, como pueden ser la presencia de fiebre, diarrea, mucositis, sepsis o sangrado activo. Encontramos que el 55% de los pacientes que participaron en el estudio, presentaban mucositis en el día de la transfusión sin objetivarse diferencias estadísticas en su gravedad antes de la transfusión de CPs-LAV y CPs-EST. En el grupo de CPs-LAV, 1 paciente tuvo un episodio de sangrado grado 2 a través de la mucosa oral debido a una mucositis grado 2 y otro paciente, un episodio de sangrado cutáneo grado 1 en el día de la transfusión. Mientras que en el grupo de CPs-EST, 1 paciente tuvo un sangrado grado 1 cutáneo, y 2 pacientes un sangrado grado 2 en la mucosa oral por una mucositis grado 2.

No hubo diferencias estadísticas entre la duración del almacenamiento de CPs-EST y CPs-LAV antes de la transfusión ($2,6 \pm 1,4$ días para CPs-EST vs $2,3 \pm 0,7$ días para CPs-LAV, $p = 0,56$).

El recuento plaquetario pre y post-transfusional, el incremento plaquetario y el CCI de ambos grupos se muestra en la Tabla 3. El contaje plaquetario pretransfusional fue similar entre CPs-EST y CPs-LAV ($18,5 \times 10^9/L$ vs $16,9 \times 10^9/L$, respectivamente). En general, observamos una tendencia a una leve reducción de la eficacia transfusional de los CPs-LAV, aunque esta diferencia sólo alcanzó la diferencia estadística en el contaje postransfusional plaquetario realizado a la hora de la transfusión (Tabla 3) Tanto el CCI a la 1 hora como a las 24 horas, y los porcentajes de transfusiones eficaces a 1 hora (CCI $> 7,5 \times 10^9/L$) y 24 horas (CCI $> 4,5 \times 10^9/L$), fueron ligeramente superiores con CPs-EST que con CPs-LAV (Tabla 3).

Es destacable que ninguno de los pacientes incluidos en este estudio tuvo reacciones transfusionales adversas o episodios de sepsis después de ser transfundido con CPs-EST o CPs-LAV.

Discusión

La transfusión de plaquetas lavadas tiene algunas indicaciones específicas como en pacientes con reacciones transfusionales alérgicas o en los raros casos de deficiencia de IgA o Hp. La dificultad técnica de desarrollar un protocolo capaz de producir consistentemente plaquetas lavadas se debe a la falta de recomendaciones internacionales [31,56]. Por este motivo, nos propusimos validar un método interno para obtener plaquetas lavadas con fines clínicos. El procedimiento es sencillo, y aumento solo en 2 horas el procesamiento habitual de CPs, y no requiere personal altamente especializado. Una vez validado, este protocolo ha sido implementado fácilmente para su uso general por técnicos experimentados del departamento de fraccionamiento de componentes sanguíneos de nuestro Centro de Regional de Hemodonación.

Nuestro protocolo de lavado de plaquetas se realiza en una centrífuga estándar de un banco de sangre, de manera similar a la mayoría de los métodos descritos anteriormente [86,87,89,90]. En contraste, muy pocos estudios han evaluado el procesamiento de plaquetas lavadas mediante el uso de dispositivos semiautomáticos, como el dispositivo Cobe 2991 (Terumo BCT, Tokio, Japón) o el ACP215 (Haemonetics Co, Braintree, MA, EE.UU.) [85,91,171]. Un inconveniente de estos equipos es la necesidad de personal más especializado, y es necesario destacar que el dispositivo COBE 2991 ya no está disponible en el mercado. Recientemente, se ha implementado un sistema de columna de fibra hueca para la preparación de CPs-LAV, con un aceptable mantenimiento de la función plaquetaria *in vitro* [92].

El inconveniente principal de los procedimientos de lavado en el entorno clínico es la pérdida de plaquetas. Estudios previos han mostrado que el procedimiento de lavado de plaquetas con una única centrifugación experimenta unas pérdidas del 4 al 18% de las plaquetas iniciales [86,90]. Mientras que los procesos con dos centrifugaciones registran unas pérdidas de plaquetas del 26 al 40% [85,87,88,92,172]. En el presente estudio, el porcentaje medio de recuperación de los CPs-LAV fue del 85%, siendo por tanto adecuado para una transfusión.

Otro efecto perjudicial del lavado de plaquetas es el deterioro de su función con el procesamiento. En nuestra evaluación *in vitro* de la calidad de las plaquetas, encontramos que las plaquetas lavadas mantuvieron su potencial de agregación, excepto con agonistas leves como el ADP. Estos hallazgos están en consonancia con publicaciones anteriores que muestran que la respuesta de agregación con colágeno no se afecta significativamente en las plaquetas lavadas, mientras que la agregación inducida por ADP o epinefrina está severamente reducida [87,89]. Aunque el sistema VerifyNow® se utiliza actualmente para la monitorización de la terapia antiplaquetaria [161], este es el primer estudio que demuestra su potencial utilidad para evaluar los productos plaquetarios en un banco de sangre. Los resultados obtenidos con el sistema VerifyNow®,

mostraron que nuestro proceso de lavado, tenía un efecto perjudicial sobre la reactividad de las plaquetas a agonistas débiles, pero no afecta significativamente a su reactividad frente a un potente agonista, como la trombina.

En contraste con algunos estudios anteriores en los que el proceso de lavado indujo una activación plaquetaria extremadamente elevada [86,91], este parámetro se vio afectado muy ligeramente en nuestras plaquetas lavadas. Como consecuencia de esta baja activación, la expresión de P-selectina en la superficie de la membrana plaquetaria tras la estimulación con TRAP fue similar antes y después del lavado, sugiriendo de nuevo un efecto menor del lavado sobre la activación y secreción plaquetaria mediada por trombina. En esta línea, Rignwald describió un bajo nivel de activación espontánea en las plaquetas lavadas, a pesar de utilizar un protocolo que implica dos etapas de centrifugación [87]. En este caso, como se tuvo una alta pérdida de plaquetas durante el lavado, se hipotetizo si las plaquetas activadas se habían perdido selectivamente durante el procedimiento. Sin embargo, estas discrepancias entre los diferentes estudios sugieren que la variabilidad del procedimiento de lavado (pasos de centrifugación, soluciones de lavado utilizadas, etc.) tiene un profundo impacto en la activación plaquetaria [86,87,89,91,92].

Una de las cuestiones más importantes en la práctica clínica diaria es si la pérdida de plaquetas y la alteración de la función plaquetaria durante el procesamiento, puede ir en detrimento de la eficacia de la transfusión. De hecho, en el presente estudio, se observó una tendencia a una mayor eficacia transfusional para transfusiones de CPs-EST en comparación con la de CPs-LAV, aunque sólo el recuento de plaquetas post-transfusional de 1 hora mostro diferencias estadísticas (Tabla 3). Es importante destacar que más del 80% de las transfusiones de CPs-LAV se definieron como transfusiones efectivas a las 24 h, y sobretodo que la transfusión de productos lavados no se asoció con un mayor número de episodios hemorrágicos. En concordancia con estos hallazgos, Azuma y colaboradores describieron que los productos de plaquetas de aféresis lavadas o sometidos a una reducción de plasma redujeron las reacciones alérgicas y las

reacciones no hemolíticas en 11 de 12 pacientes, proporcionando CCI adecuados a 1 hora y en 24 horas, sin asociarse con eventos hemorrágicos [66]. En contraste, Karafin y colaboradores objetivaron diferencias significativas entre aféresis estándar y lavadas de entre un 32,2 y un 50,6% en el de CCI 1 hora y 24 horas. Estos datos se pueden explicar por la alta pérdida de plaquetas en su protocolo de lavado o complicaciones no registradas en los receptores, como esplenomegalia y fiebre [172].

El diseño utilizado en este estudio, dos transfusiones de plaquetas en el mismo paciente en un corto período de tiempo, tenía como objetivo minimizar el efecto de variables clínicas de los pacientes sobre la eficacia de la transfusión y maximizar la influencia del propio producto plaquetario. Sin embargo, una limitación de este estudio es el bajo número de pacientes evaluados, por lo tanto son necesarias series más amplias para asegurar la eficacia clínica de las plaquetas lavadas según nuestro procedimiento. Otro inconveniente del estudio es la población seleccionada, dada la baja prevalencia de pacientes con reacciones transfusiones alérgicas previas o deficiencias de IgA o Hp hace inviable la realización del estudio en estos pacientes, para los cuales las plaquetas lavadas son las más indicadas.

En resumen, hemos implementado un proceso simple para preparar las plaquetas lavadas, con un impacto menor en la recuperación plaquetaria, activación y función plaquetaria. Un estudio piloto transfusional validó la eficacia hemostática de estas plaquetas lavadas. Es preciso la realización de estudios en pacientes con reacciones alérgicas transfusionales o déficit de IgA o Hp para evaluar la efectividad de este producto en la prevención de reacciones transfusionales indeseables mediadas por proteínas plasmáticas contenidas en los CPs.

Agradecimientos

Agradecemos a nuestros compañeros clínicos y de laboratorio del Servicio de Hematología y Oncología Médica, del Hospital Universitario Morales Meseguer y del Centro Regional de Hemodonación, por su ayuda en la realización del estudio.

Este proyecto de investigación ha sido financiado por becas de investigación del Instituto de Salud Carlos III (PI14/01956, CB15/00055) y la Fundación Séneca (19873/GERM/15).

Tabla 1. Características *in vitro* de los concentrados de plaquetas estándar y lavados

Parámetros	Estándar	Plaquetas lavadas		Valor P
		Pre-manipulación	Post-manipulación	
Volumen (ml)	365±20	366±11	353±20 [#]	0.04
Plaquetas				
(x10 ⁹ /L)	1,090±100	1,152±161	1,009±113 [#]	< 0.01
(x10 ⁹ /unidad)	397±30	423±63.6	356±41 ^{#*}	< 0.01
CD62 (% Plaquetas+)				
Activación espontánea (%)	18.7±7	14.8±1.8	23.6±7 [#]	0.03
Activación inducida por TRAP (%)	88.7±10.8	88.6±6.8	85.0±7,3 [#]	0.02
VerifyNow P2Y12 (PRU)				
Inducida por ADP		32.2±37.7	4.2±2,4 [#]	0.03
Inducida por TRAP		275.2±55.9	263.3±63.3	0.62
Test de agregación				
1.6 mM AA	87.2±4.9	87.3±6,1	83.5±9,3	0.12
1.25 mg/mL Ristocetina	93.9±6.6 [^]	94.9±6,8 [^]	102.8±6,3	<0.01
2 µg/mL Colágeno	87.7±8.7	84.7±8,2	90.3±11,5	0.15
25 µM TRAP	89.9±9.1 [^]	91.0±5,8 [^]	95.2±3,3	0.046

Los valores mostrados son la media media ± desviación estándar de las 22 unidades diferentes estudiadas. AA= ácido araquidónico, ADP= adenosina difosfato, PRU= unidades de reactividad P2Y12, y TRAP= péptido activador del receptor de trombina. * P<0.05 frente a concentrados de plaquetas estándar. # P<0.05 frente a concentrados de plaquetas lavados premanipulación. ^P<0.05 frente a concentrados de plaquetas lavados postmanipulación.

Tabla 2. Características clínicas y complicaciones hemorrágicas en pacientes transfundidos con plaquetas estándar o lavadas

Características	Plaquetas		Valor P
	CPs-EST	CPs-LAV	
Fiebre			1
No	8 (83)	8 (83)	
Si	3 (27)	3 (27)	
Diarrea			0.31
No	10 (91)	11 (100)	
Si	1 (9)	0	
Mucositis			0.68
No	5 (46)	5 (46)	
Grado 1	1 (9)	2 (18)	
Grado 2	1 (9)	0	
Grado 3	2 (18)	4 (36)	
Grado 4	2 (18)	0	
Sangrado			1
No	8 (73)	9 (82)	
Si	3 (27)	2 (18)	

Los valores mostrados son expresados como porcentaje (%) de los 11 pacientes evaluados. CPs-LAV= concentrados de plaquetas lavados; CPs-EST= concentrados de plaquetas estándar.

Tabla 3. Evaluación de la eficacia transfusional de plaquetas estándar y lavadas

Parámetros	Plaquetas		
	CPs-EST	CPs-LAV	Valor P
Número de transfusiones de plaquetas	11	11	
Contaje plaquetario pre-transfusional (x10 ⁹ /L)	18.4±7.3	16.9±8.7	0.66
Contaje plaquetario post-transfusional tras 1h (x10 ⁹ /L)	49.1±16.2	42±18	0.35
Contaje plaquetario post-transfusional tras 24h (x10 ⁹ /L)	44.1±23	36.1±15.5	0.35
PPI_1h (x10 ⁹ /L)	30.6±16	24.8±19.5	0.46
PPI_24h (x10 ⁹ /L)	25.6±18.9	19.2±16.6	0.4
CCI_1h (x10 ⁹ /L)	13.5±5.6	11.5±7.3	0.49
CCI_24h (x10 ⁹ /L)	11± 7.2	9±6.5	0.48
CCI_1 h > 7500 - % de las transfusiones	10 (91%)	6(54%)	0.056
CCI_24 h > 4500 - % de las transfusiones	10 (91%)	9 (82%)	0.56

Los valores mostrados son expresados como la media ± desviación estándar o porcentaje (%) de los 11 pacientes evaluados. CCI= incremento plaquetario corregido; CPs-EST= concentrados de plaquetas estándar; CPs-LAV= concentrados de plaquetas lavados; PPI= incremento plaquetario post-transfusional.

Conclusiones

8. Conclusiones

Del análisis de los resultados obtenidos en las investigaciones que conforman el presente Proyecto de Tesis Doctoral, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Bajo nuestras condiciones experimentales, los CPs preparados con el equipo OrbiSac y TACSI son equivalentes en términos de recuperación celular, preservación de la función plaquetaria *in vitro* y el metabolismo durante el almacenamiento.
2. El sistema OrbiSac comparado con TACSI, parece exponer las plaquetas a un mayor estrés mecánico, resultando en concentraciones transitoriamente mayores de sustancias proinflamatorias derivadas de plaquetas en los CPs. La vasta experiencia en la transfusión de CPs preparados con OrbiSac, indica que esta diferencia carece de relevancia clínica.
3. Nuestro estudio clínico retrospectivo muestra que la transfusión de CPs-BC, en comparación con la transfusión de CPs-PRP, favorece incrementos mayores del conteo de plaquetas postransfusión y reduce de forma moderada, pero significa, la exposición a donantes por episodios de transfusión de CPs derivados de sangre total. Sin embargo, los CPs-BC son equivalentes a los CPs-PRP en términos de prevención de complicaciones hemorrágicas mayores en pacientes con TAPH.
4. En nuestro estudio se demuestra que las condiciones clínicas del paciente, como el tipo de enfermedad, la esplenomegalia y la profilaxis de enfermedad injerto contra huésped utilizada, intervienen de forma importante en el resultado de la transfusión y deben considerarse en la estimación del riesgo de hemorragia del paciente independientemente del producto plaquetario que se transfunda.

5. Bajo nuestras condiciones experimentales, un proceso de lavado de unidades de plaquetas de BC con solución aditiva, simple y rápido, permite una recuperación del 85% de las plaquetas originales.
6. Bajo condiciones de almacenamiento rutinario, los CPs-BC lavados con solución aditiva, muestran características de calidad *in vitro* comparables a las de CPs convencionales.
7. De acuerdo con los datos de nuestra investigación, los concentrados de plaquetas lavadas son una opción transfusional segura, alcanzándose un porcentaje de transfusiones efectivas del 80%.

***Difusión de los Resultados Científicos del
Proyecto de Tesis Doctoral***

9. Difusión de los Resultados Científicos del Proyecto de Tesis Doctoral

Las investigaciones y resultados que conforman el presente Proyecto de Tesis Doctoral, han sido difundidos a la comunidad científica nacional e internacional a través de las siguientes presentaciones en congresos y artículos en revistas de la especialidad:

A) Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.

1. **Fernández H**, Torregrosa J.M, Plaza E, Romera M, Castila-Llorente C, Heras I, Lozano M.L, Ferrer-Marín F, Vicente V, Rivera J. Estudio de eficacia y seguridad de la transfusión profiláctica de concentrados de plaquetas procesadas por el método de PRP versus Buffy coat en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Comunicación oral. Congreso Nacional SETS XXIV. Murcia 20-22 de junio de 2013.
2. **Fernández H**, Romera M, Castilla-Llorente C, Torregrosa JM, Plaza E, Heras I, Lozano ML, Ferrer-Marín F, Vicente V y Rivera J. Estudio de Eficacia y Seguridad de la Transfusión Profiláctica de Concentrados de Plaquetas Procesadas por el Método de PRP versus Buffy coat en Pacientes Sometidos a Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos. Póster comentado. Congreso Nacional SETH LV y Congreso Nacional SETH XXIX. Sevilla 17 al 19 de octubre de 2013.
3. Martínez Millán D.C, **Fernández H**, Plaza E, Castilla-Llorente C, Amigo ML, Heras I, Iniesta P, Cascales A, Lozano ML, Ferrer-Marín F, Vicente V y Rivera J. Estudio de Activación y Funcionalidad in vitro de Concentrados de Plaquetas Lavados con Solución Aditiva y Comparación de Eficacia Transfusional con Concentrados de Plaquetas buffy coat estándar. Póster comentado. Congreso Nacional SETH LV y Congreso Nacional SETH XXIX. Sevilla 17 al 19 de octubre de 2013.

4. **Fernández-Muñoz H**, Castilla-Llorente C, Heras I, Plaza E, Lozano M.L, Ferrer-Marin F, Vicente V, y Rivera J. Estudio comparativo de eventos hemorrágicos en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos que recibieron transfusiones profilácticas de concentrados de plaquetas procesadas por el método de PRP vs buffy-coat. Comunicación póster defensa. Congreso Nacional SETS XXVII. Bilbao 23-25 de junio de 2016.

B) Artículos publicados en revistas de difusión internacional.

1. Plaza EM, Céspedes P, **Fernández H**, Sánchez-Guiu MI, Egea JM, Vicente V, Lozano ML, Rivera J. Quality assessment of buffy coat-derived leucodepleted platelet concentrates in PAS-plasma, prepared by the OrbiSac or TACSI automated system. Vox Sang. 2014 Jan;106(1):38-44.

2. **Fernández-Muñoz H**, Castilla-Llorente C, Plaza EM, Martínez-Millán C, Heras I, Iniesta P, Amigo ML, Ferrer-Marin F, Candela MJ, Lozano ML, Vicente V, Rivera J. Quality assessment and transfusion efficacy of buffy coat-derived platelet concentrates washed with platelet additive solution. Blood Transfus. 2018 May;16(3):273-278.

3. **Fernández-Muñoz H**, Plaza EM, Rivera-Caravaca JM, Candela MJ, Romera M, De Arriba F, Lozano ML, Vicente V, Heras I, Castilla-Llorente C, Rivera J. Comparative assessment of prophylactic transfusions of platelet concentrates obtained by the PRP or buffy coat methods, in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Hematology. 2018 Mar 27:1-

Referencias

10. Referencias

1. Mancuso ME, Santagostino E. Platelets: Much more than bricks in a breached wall. *British Journal of Haematology*. 2017;178: 209–219.
2. Becker RC, Sexton T, Smyth SS. Translational implications of platelets as vascular first responders. *Circulation Research*. 2018;122: 506–522.
3. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. By W.W. Duke. *JAMA*. 1983;250: 1201–1209.
4. Estcourt LJ. Why has demand for platelet components increased? A review. *Transfusion Medicine*. 2014;24: 260–268.
5. Estcourt L, Stanworth S, Doree C, Hopewell S, Murphy MF, Tinmouth A, et al. Prophylactic platelet transfusion for prevention of bleeding in patients with haematological disorders after chemotherapy and stem cell transplantation. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012; CD004269.
6. Meer PF van der. Platelet concentrates, from whole blood or collected by apheresis? *Transfusion and Apheresis Science*. 2013;48: 129–131.
7. Hirayama F. Current understanding of allergic transfusion reactions: Incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. *British Journal of Haematology*. 2013;160: 434–444.
8. Gaydos LA, Freireich EJ, Mantel N. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 1962;266: 905–909.
9. Slichter SJ. Controversies in platelet transfusion therapy. *Annual Review of Medicine*. 1980;31: 509–540.
10. Sullivan MT, McCullough J, Schreiber GB, Wallace EL. Blood collection and transfusion in the united states in 1997. *Transfusion*. 2002;42: 1253–1260.
11. Rebullà P, Finazzi G, Marangoni F, Avvisati G, Gugliotta L, Tognoni G, et al. The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute

myeloid leukemia. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337: 1870–1875.

12. Heckman KD, Weiner GJ, Davis CS, Strauss RG, Jones MP, Burns CP. Randomized study of prophylactic platelet transfusion threshold during induction therapy for adult acute leukemia: 10,000/microL versus 20,000/microL. *Journal of Clinical Oncology*. 1997;15: 1143–1149.

13. Zumberg MS, Rosario MLU del, Nejame CF, Pollock BH, Garzarella L, Kao KJ, et al. A prospective randomized trial of prophylactic platelet transfusion and bleeding incidence in hematopoietic stem cell transplant recipients: 10,000/microL versus 20,000/microL trigger. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2002;8: 569–576.

14. British Committee for Standards in Haematology BTTF. Guidelines for the use of platelet transfusions. *British Journal of Haematology*. 2003;122: 10–23.

15. Schiffer CA, Anderson KC, Bennett CL, Bernstein S, Elting LS, Goldsmith M, et al. Platelet transfusion for patients with cancer: Clinical practice guidelines of the american society of clinical oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19: 1519–1538.

16. Slichter SJ. Evidence-based platelet transfusion guidelines. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2007; 172–178.

17. Estcourt LJ, Stanworth SJ, Doree C, Hopewell S, Trivella M, Murphy MF. Comparison of different platelet count thresholds to guide administration of prophylactic platelet transfusion for preventing bleeding in people with haematological disorders after myelosuppressive chemotherapy or stem cell transplantation. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015; CD010983.

18. Hanson SR, Slichter SJ. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: Evidence for a fixed platelet requirement. *Blood*. 1985;66: 1105–1109.

19. Nachman RL, Rafii S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *The New England Journal of Medicine*. 2008;359: 1261–1270.
20. Hersh JK, Hom EG, Brecher ME. Mathematical modeling of platelet survival with implications for optimal transfusion practice in the chronically platelet transfusion-dependent patient. *Transfusion*. 1998;38: 637–644.
21. Tinmouth A, Tannock IF, Crump M, Tomlinson G, Brandwein J, Minden M, et al. Low-dose prophylactic platelet transfusions in recipients of an autologous peripheral blood progenitor cell transplant and patients with acute leukemia: A randomized controlled trial with a sequential bayesian design. *Transfusion*. 2004;44: 1711–1719.
22. Heddle NM, Cook RJ, Tinmouth A, Kouroukis CT, Hervig T, Klapper E, et al. A randomized controlled trial comparing standard- and low-dose strategies for transfusion of platelets (SToP) to patients with thrombocytopenia. *Blood*. 2009;113: 1564–1573.
23. Slichter SJ, Kaufman RM, Assmann SF, McCullough J, Triulzi DJ, Strauss RG, et al. Dose of prophylactic platelet transfusions and prevention of hemorrhage. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362: 600–613.
24. Friedmann AM, Sengul H, Lehmann H, Schwartz C, Goodman S. Do basic laboratory tests or clinical observations predict bleeding in thrombocytopenic oncology patients? A reevaluation of prophylactic platelet transfusions. *Transfusion Medicine Reviews*. 2002;16: 34–45.
25. Vinholt PJ, Alnor A, Nybo M, Hvas A-M. Prediction of bleeding and prophylactic platelet transfusions in cancer patients with thrombocytopenia. *Platelets*. 2016;27: 547–554.
26. Stanworth SJ, Hyde C, Brunskill S, Murphy MF. Platelet transfusion prophylaxis for patients with haematological malignancies: Where to now? *British Journal of Haematology*. 2005;131: 588–595.

27. Wandt H, Schaefer-Eckart K, Frank M, Birkmann J, Wilhelm M. A therapeutic platelet transfusion strategy is safe and feasible in patients after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2006;37: 387–392.
28. Wandt H, Schaefer-Eckart K, Wendelin K, Pilz B, Wilhelm M, Thalheimer M, et al. Therapeutic platelet transfusion versus routine prophylactic transfusion in patients with haematological malignancies: An open-label, multicentre, randomised study. *Lancet*. 2012;380: 1309–1316.
29. Stanworth SJ, Estcourt LJ, Powter G, Kahan BC, Dyer C, Choo L, et al. A no-prophylaxis platelet-transfusion strategy for hematologic cancers. *The New England Journal of Medicine*. 2013;368: 1771–1780.
30. Estcourt LJ, Heddle N, Kaufman R, McCullough J, Murphy MF, Slichter S, et al. The challenges of measuring bleeding outcomes in clinical trials of platelet transfusions. *Transfusion*. 2013;53: 1531–1543.
31. Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular. Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos. 5ª edición. Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular; 2015.
32. Savage WJ, Tobian AAR, Savage JH, Wood RA, Schroeder JT, Ness PM. Scratching the surface of allergic transfusion reactions. *Transfusion*. 2013;53: 1361–1371.
33. Anani W, Triulzi D, Yazer MH, Qu L. Relative IgA-deficient recipients have an increased risk of severe allergic transfusion reactions. *Vox Sanguinis*. 2014;107: 389–392.
34. Sandler SG, Eder AF, Goldman M, Winters JL. The entity of immunoglobulin A-related anaphylactic transfusion reactions is not evidence based. *Transfusion*. 2015;55: 199–204.

35. Dewachter P, Castro S, Nicaise-Roland P, Chollet-Martin S, Le Beller C, Lillo-le-Louet A, et al. Anaphylactic reaction after methylene blue-treated plasma transfusion. *British Journal of Anaesthesia*. 2011;106: 687–689.
36. Jacobs JFM, Baumert JL, Brons PP, Joosten I, Koppelman SJ, Pampus ECM van. Anaphylaxis from passive transfer of peanut allergen in a blood product. *The New England Journal of Medicine*. 2011;364: 1981–1982.
37. Gao L, Sha Y, Yuan K, Ling L, Ai D, Ying H, et al. Allergic transfusion reaction caused by the shrimp allergen of donor blood: A case report. *Transfusion and Apheresis Science*. 2014;50: 68–70.
38. Gilstad CW. Anaphylactic transfusion reactions. *Current Opinion in Hematology*. 2003;10: 419–423.
39. Geiger TL, Howard SC. Acetaminophen and diphenhydramine premedication for allergic and febrile nonhemolytic transfusion reactions: Good prophylaxis or bad practice? *Transfusion Medicine Reviews*. 2007;21: 1–12.
40. Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, Shindou H, Yoshida M, Nishikado H, et al. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*. 2008;28: 581–589.
41. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, et al. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *The New England Journal of Medicine*. 2008;358: 28–35.
42. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F. Platelets and cytokines: How and why? *Transfusion Clinique et Biologique*. 2012;19: 104–108.
43. Maunsell K. Desensitization in allergic recipients after serum transfusions. *British Medical Journal*. 1944;2: 236–239.

44. Savage WJ, Tobian AAR, Savage JH, Hamilton RG, Ness PM. Atopic predisposition of recipients in allergic transfusion reactions to apheresis platelets. *Transfusion*. 2011;51: 2337–2342.
45. Savage WJ, Tobian AA, Fuller AK, Wood RA, King KE, Ness PM. Allergic transfusion reactions to platelets are associated more with recipient and donor factors than with product attributes. *Transfusion*. 2011;51: 1716–1722.
46. Azuma H, Yamaguchi M, Takahashi D, Fujihara M, Sato S, Kato T, et al. Elevated Ca^{2+} influx-inducing activity toward mast cells in pretransfusion sera from patients who developed transfusion-related adverse reactions. *Transfusion*. 2009;49: 1754–1761.
47. Johansson SGO, Nopp A, Florvaag E, Lundahl J, Söderström T, Guttormsen AB, et al. High prevalence of IgE antibodies among blood donors in Sweden and Norway. *Allergy*. 2005;60: 1312–1315.
48. Arnold DM, Blajchman MA, Ditomasso J, Kulczycki M, Keith PK. Passive transfer of peanut hypersensitivity by fresh frozen plasma. *Archives of Internal Medicine*. 2007;167: 853–854.
49. Morishita K, Wakamoto S, Miyazaki T, Sato S, Fujihara M, Kaneko S, et al. Life-threatening adverse reaction followed by thrombocytopenia after passive transfusion of fresh frozen plasma containing anti-CD36 (Nak) isoantibody. *Transfusion*. 2005;45: 803–806.
50. Abe T, Matsumoto C, Shimada E, Mazda T, Takanashi M, Kawaguchi K, et al. Immunoglobulin E oligomers identified in blood components activate mast cells: Relevance to anaphylactic transfusion reaction. *Transfusion*. 2011;51: 2327–2336.
51. Vyas GN, Perkins HA, Yang YM, Basantani GK. Healthy blood donors with selective absence of immunoglobulin a: Prevention of anaphylactic transfusion reactions caused by antibodies to IgA. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1975;85: 838–842.

52. Winters JL, Moore SB, Sandness C, Miller DV. Transfusion of apheresis plts from IgA-deficient donors with anti-IgA is not associated with an increase in transfusion reactions. *Transfusion*. 2004;44: 382–385.
53. Abe T, Shimada E, Takanashi M, Takamura T, Motoji K, Okazaki H, et al. Antibody against immunoglobulin E contained in blood components as causative factor for anaphylactic transfusion reactions. *Transfusion*. 2014;54: 1953–1960.
54. Johansson SGO, Nopp A, Hage M van, Olofsson N, Lundahl J, Wehlin L, et al. Passive IgE-sensitization by blood transfusion. *Allergy*. 2005;60: 1192–1199.
55. Branch DR, Gifford H. Allergic reaction to transfused cephalothin antibody. *JAMA*. 1979;241: 495–496.
56. Fung MK. Technical manual, 18th edition. American Association of Blood Banks Press; 2014.
57. Tobian AAR, King KE, Ness PM. Transfusion premedications: A growing practice not based on evidence. *Transfusion*. 2007;47: 1089–1096.
58. Patterson BJ, Freedman J, Blanchette V, Sher G, Pinkerton P, Hannach B, et al. Effect of premedication guidelines and leukoreduction on the rate of febrile nonhaemolytic platelet transfusion reactions. *Transfusion Medicine*. 2000;10: 199–206.
59. Wang SE, Lara PN, Lee-Ow A, Reed J, Wang LR, Palmer P, et al. Acetaminophen and diphenhydramine as premedication for platelet transfusions: A prospective randomized double-blind placebo-controlled trial. *American Journal of Hematology*. 2002;70: 191–194.
60. Sanders RP, Maddirala SD, Geiger TL, Pounds S, Sandlund JT, Ribeiro RC, et al. Premedication with acetaminophen or diphenhydramine for transfusion with leucoreduced blood products in children. *British Journal of Haematology*. 2005;130: 781–787.

61. Kennedy LD, Case LD, Hurd DD, Cruz JM, Pomper GJ. A prospective, randomized, double-blind controlled trial of acetaminophen and diphenhydramine pretransfusion medication versus placebo for the prevention of transfusion reactions. *Transfusion*. 2008;48: 2285–2291.
62. Martí-Carvajal AJ, Solà I, González LE, Leon de Gonzalez G, Rodriguez-Malagon N. Pharmacological interventions for the prevention of allergic and febrile non-haemolytic transfusion reactions. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010; CD007539.
63. Yanagisawa R, Shimodaira S, Sakashita K, Hidaka Y, Kojima S, Nishijima F, et al. Factors related to allergic transfusion reactions and febrile non-haemolytic transfusion reactions in children. *Vox Sanguinis*. 2016;110: 376–384.
64. Heddle NM, Blajchman MA, Meyer RM, Lipton JH, Walker IR, Sher GD, et al. A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and prestorage WBC-reduced platelets. *Transfusion*. 2002;42: 556–566.
65. Heddle NM, Klama L, Meyer R, Walker I, Boshkov L, Roberts R, et al. A randomized controlled trial comparing plasma removal with white cell reduction to prevent reactions to platelets. *Transfusion*. 1999;39: 231–238.
66. Azuma H, Hirayama J, Akino M, Miura R, Kiyama Y, Imai K, et al. Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-Sol). *Transfusion*. 2009;49: 214–218.
67. Tobian AAR, Savage WJ, Tisch DJ, Thoman S, King KE, Ness PM. Prevention of allergic transfusion reactions to platelets and red blood cells through plasma reduction. *Transfusion*. 2011;51: 1676–1683.
68. Mintz P. *Transfusion therapy, clinical principles and practice*, 3rd edition. American Association of Blood Banks Press; 2010.

69. Keklik M, Eser B, Kaynar L, Solmaz M, Ozturk A, Yay M, et al. Comparison of double dose plateletpheresis on the Fenwal Amicus, Fresenius COM.TEC and Trima Accel Cell separators. *Transfusion and Apheresis Science*. 2014;51: 193–196.
70. Keklik M, Eser B, Kaynar L, Sivgin S, Keklik E, Solmaz M, et al. Comparison of plateletpheresis on the Fenwal Amicus, Fresenius COM.TEC, and Trima Accel Cell separators. *Journal of Clinical Apheresis*. 2015;30: 171–175.
71. Chaudhary R, Das SS, Khetan D, Ojha S, Verma S. Comparative study of automated plateletpheresis using five different apheresis systems in a tertiary care hospital. *Transfusion and Apheresis Science*. 2009;40: 99–103.
72. Fontana S, Keller P, Taleghani BM. Platelet recruitment during multiple donor platelet apheresis differs between cell separators. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011;38: 195–198.
73. Dumont LJ, Cancelas JA, Graminske S, Friedman KD, Vassallo RR, Whitley PH, et al. In vitro and in vivo quality of leukoreduced apheresis platelets stored in a new platelet additive solution. *Transfusion*. 2013;53: 972–980.
74. Thiele T, Alt-Mayer T, Greinacher A, Bux J. Implications of a switch to a 100% apheresis platelet supply for patients and for blood donors: a risk benefit analysis. *Vox Sanguinis*. 2016;111: 350–356.
75. Lozano ML, Rivera J, Vicente V. Concentrados de plaquetas procedentes de sangre total (buffy coat) u obtenidos por aféresis, ¿qué producto emplear? *Medicina Clínica*. 2012;138: 528–533.
76. Amrein K, Valentin A, Lanzer G, Drexler C. Adverse events and safety issues in blood donation—a comprehensive review. *Blood Reviews*. 2012;26: 33–42.
77. Richa E, Krueger P, Burgstaler EA, Bryant SC, Winters JL. The effect of double- and triple-apheresis platelet product donation on apheresis donor platelet and white blood cell counts. *Transfusion*. 2008;48: 1325–1332.

78. Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. *Current Opinion in Hematology*. 2006;13: 323–330.
79. Cid J, Magnano L, Lozano M. Automation of blood component preparation from whole blood collections. *Vox Sanguinis*. 2014;107: 10–18.
80. Chicchi R, Biguzzi R, Santarelli R. The OrbiSac system: Results and organizational impact. *Blood Transfusion*. 2007;5: 15–19.
81. Johnson L, Winter KM, Kwok M, Reid S, Marks DC. Evaluation of the quality of blood components prepared using the reveals automated blood processing system. *Vox Sanguinis*. 2013;105: 225–235.
82. Gulliksson H. Platelet storage media. *Vox Sanguinis*. 2014;107: 205–212.
83. Azuma H, Hirayama J, Akino M, Ikeda H. Platelet additive solution - electrolytes. *Transfusion and Apheresis Science*. 2011;44: 277–281.
84. Meer PF van der. PAS or plasma for storage of platelets? A concise review. *Transfusion Medicine*. 2016;26: 339–342.
85. Kelley WE, Edelman BB, Drachenberg CB, Hess JR. Washing platelets in neutral, calcium-free, Ringer's acetate. *Transfusion*. 2009;49: 1917–1923.
86. Schoenfeld H, Muhm M, Doepfmer U, Exadaktylos A, Radtke H. Platelet activity in washed platelet concentrates. *Anesthesia and Analgesia*. 2004;99: 17–20.
87. Ringwald J, Althoff F, Zimmermann R, Strasser E, Weisbach V, Zingsem J, et al. Washing platelets with new additive solutions: Aspects on the in vitro quality after 48 hours of storage. *Transfusion*. 2006;46: 236–243.
88. Tynngård N, Trinks M, Berlin G. Platelet quality after washing: The effect of storage time before washing. *Transfusion*. 2010;50: 2745–2752.
89. Tynngård N, Trinks M, Berlin G. In vitro quality of platelets during prolonged storage after washing with three platelet additive solutions. *Vox Sanguinis*. 2012;102: 32–39.

90. Oikawa S, Taguchi T, Endo K, Hoshi T, Kawashima W, Horibe Y, et al. Storage of washed platelets in BRS-A platelet additive solutions based on two types of clinically available bicarbonated Ringer's solutions with different electrolyte concentrations. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015;53: 233–237.
91. Veeraputhiran M, Ware J, Dent J, Bornhorst J, Post G, Cottler-Fox M, et al. A comparison of washed and volume-reduced platelets with respect to platelet activation, aggregation, and plasma protein removal. *Transfusion*. 2011;51: 1030–1036.
92. Tanaka S, Hayashi T, Sugaya S, Osabe M, Ueno Y, Tani Y, et al. A hollow-fibre column system to effectively prepare washed platelets. *Vox Sanguinis*. 2015;109: 239–247.
93. Hirayama J, Azuma H, Fujihara M, Akino M, Homma C, Kato T, et al. Comparison between in vitro qualities of platelets washed with commercially available additive solutions and those washed with M-Sol. *Vox Sanguinis*. 2010;99: 131–135.
94. Oikawa S, Minegishi M, Endo K, Kawashima W, Suzuki K, Shimizu H. In vitro analysis of volume-reduced washed platelet concentrates stored in bicarbonated Ringer's solution containing less than 5% residual plasma. *Vox Sanguinis*. 2016;111: 16–21.
95. Salunkhe V, Meer PF van der, Korte D de, Seghatchian J, Gutiérrez L. Development of blood transfusion product pathogen reduction treatments: A review of methods, current applications and demands. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015;52: 19–34.
96. Kaiser-Guignard J, Canellini G, Lion N, Abonnenc M, Osselaer J-C, Tissot J-D. The clinical and biological impact of new pathogen inactivation technologies on platelet concentrates. *Blood Reviews*. 2014;28: 235–241.

97. Magron A, Laugier J, Provost P, Boilard E. Pathogen reduction technologies: The pros and cons for platelet transfusion. *Platelets*. 2018;29: 2–8.
98. Estcourt LJ, Malouf R, Hopewell S, Trivella M, Doree C, Stanworth SJ, et al. Pathogen-reduced platelets for the prevention of bleeding. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;7: CD009072.
99. Milford EM, Reade MC. Comprehensive review of platelet storage methods for use in the treatment of active hemorrhage. *Transfusion*. 2016;56 Suppl 2: S140–S148.
100. Walther-Wenke G, Däubener W, Heiden M, Hoch J, Hornei B, Volkers P, et al. Effect of safety measures on bacterial contamination rates of blood components in germany. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2011;38: 231–235.
101. Capocelli KE, Dumont LJ. Novel platelet storage conditions: Additive solutions, gas, and cold. *Current Opinion in Hematology*. 2014;21: 491–496.
102. Johnson L, Tan S, Wood B, Davis A, Marks DC. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: A comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*. 2016;56: 1807–1818.
103. Getz TM, Montgomery RK, Bynum JA, Aden JK, Pidcoke HF, Cap AP. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*. 2016;56: 1320–1328.
104. Dumont LJ, Cancelas JA, Dumont DF, Siegel AH, Szczepiorkowski ZM, Rugg N, et al. A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethyl sulfoxide-frozen autologous platelets in healthy volunteers. *Transfusion*. 2013;53: 128–137.

105. Slichter SJ, Jones M, Ransom J, Gettinger I, Jones MK, Christoffel T, et al. Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets. *Transfusion Medicine Reviews*. 2014;28: 212–225.
106. Cid J, Escolar G, Galan A, López-Vilchez I, Molina P, Díaz-Ricart M, et al. In vitro evaluation of the hemostatic effectiveness of cryopreserved platelets. *Transfusion*. 2016;56: 580–586.
107. Noorman F, Dongen TTCF van, Plat M-CJ, Badloe JF, Hess JR, Hoencamp R. Transfusion: -80°C frozen blood products are safe and effective in military casualty care. *PloS One*. 2016;11: e0168401.
108. Mittal K, Kaur R. Platelet storage lesion: An update. *Asian Journal of Transfusion Science*. 2015;9: 1–3.
109. Ohto H, Nollet KE. Overview on platelet preservation: Better controls over storage lesion. *Transfusion and Apheresis Science*. 2011;44: 321–325.
110. Bertolini F, Murphy S. A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. *Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion*. *Transfusion*. 1996;36: 128–132.
111. Kunicki TJ, Tuccelli M, Becker GA, Aster RH. A study of variables affecting the quality of platelets stored at “room temperature”. *Transfusion*. 1975;15: 414–421.
112. Holme S, Moroff G, Murphy S. A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: The tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. *Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion*. *Transfusion*. 1998;38: 31–40.
113. Labrie A, Marshall A, Bedi H, Maurer-Spurej E. Characterization of platelet concentrates using dynamic light scattering. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013;40: 93–100.

114. Panzer S, Jilma P. Methods for testing platelet function for transfusion medicine. *Vox Sanguinis*. 2011;101: 1–9.
115. Devine DV, Serrano K. The platelet storage lesion. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2010;30: 475–487.
116. Rivera J, Lozano ML, Vicente V. In vitro changes of platelet parameters: Lessons from blood banking. *Methods in molecular biology*. 2004;273: 57–72.
117. E Kehrel B, F Brodde M. State of the art in platelet function testing. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013;40: 73–86.
118. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 16th edn. Strasbourg, France, Council of Europe Pub; 2011.
119. Nemkov T, Hansen KC, Dumont LJ, D'Alessandro A. Metabolomics in transfusion medicine. *Transfusion*. 2016;56: 980–993.
120. Zimring JC, Slichter S, Odem-Davis K, Felcyn JR, Kapp LM, Bell LN, et al. Metabolites in stored platelets associated with platelet recoveries and survivals. *Transfusion*. 2016;56: 1974–1983.
121. Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Markers of platelet apoptosis: Methodology and applications. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2012;33: 397–411.
122. Acker JP, Marks DC, Sheffield WP. Quality assessment of established and emerging blood components for transfusion. *Journal of Blood Transfusion*. 2016;2016: 4860284.
123. Tynngård N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. *Transfusion and Apheresis Science*. 2009;41: 97–104.
124. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: A comparative review. *Vascular Health and Risk Management*. 2015;11: 133–148.

125. Tynngård N, Lindahl TL, Ramström S. Assays of different aspects of haemostasis - what do they measure? *Thrombosis Journal*. 2015;13: 8.
126. Bontekoe IJ, Meer PF van der, Korte D de. Determination of thromboelastographic responsiveness in stored single-donor platelet concentrates. *Transfusion*. 2014;54: 1610–1618.
127. Heal JM, Blumberg N. Optimizing platelet transfusion therapy. *Blood Reviews*. 2004;18: 149–165.
128. Lozano M, Estebanell E, Cid J, Diaz-Ricart M, Mazzara R, Ordinas A, et al. Platelet concentrates prepared and stored under currently optimal conditions: Minor impact on platelet adhesive and cohesive functions after storage. *Transfusion*. 1999;39: 951–959.
129. Anderson NA, Gray S, Copplestone JA, Chan DC, Hamon M, Prentice AG, et al. A prospective randomized study of three types of platelet concentrates in patients with haematological malignancy: Corrected platelet count increments and frequency of nonhaemolytic febrile transfusion reactions. *Transfusion medicine*. 1997;7: 33–39.
130. Pietersz RN, Reesink HW, Dekker WJ, Fijen FJ. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. I. Special inserts for centrifuge cups. *Vox Sanguinis*. 1987;53: 203–207.
131. Gulliksson H, Sjödin A, Sandgren P, Vesterinen M, Larsson S, Diedrich B. Automated preparation of platelet concentrates from pooled buffy coats using the Gambro OrbiSac system. *Transfusion and Apheresis Science*. 2003;29: 11–12.
132. Janetzko K, Klüter H, Waeg G van, Eichler H. Fully automated processing of buffy coat-derived pooled platelet concentrates. *Transfusion*. 2004;44: 1052–1058.
133. Thon JN, Schubert P, Devine DV. Platelet storage lesion: A new understanding from a proteomic perspective. *Transfusion Medicine Reviews*. 2008;22: 268–279.

134. Larsson S, Sandgren P, Sjödin A, Vesterinen M, Gulliksson H. Automated preparation of platelet concentrates from pooled buffy coats: In vitro studies and experiences with the OrbiSac system. *Transfusion*. 2005;45: 743–751.
135. Larrea González L, Oritz de Salazar MI, Roig R, Soler MA. Platelet activation during storage of platelet concentrates processed from buffy coats by the automated OrbiSac system. *Transfusion*. 2007;47: 1555–6; author reply 1556.
136. Vetlesen A, Mirlashari MR, Ezligini F, Kjeldsen-Kragh J. Evaluation of platelet activation and cytokine release during storage of platelet concentrates processed from buffy coats either manually or by the automated OrbiSac system. *Transfusion*. 2007;47: 126–132.
137. Dijkstra-Tiekstra MJ, Kuipers W, Setroikromo AC, Wildt-Eggen J de. Platelet capacity of various platelet pooling systems for buffy coat-derived platelet concentrates. *Transfusion*. 2008;48: 2114–2121.
138. Cid J, Ramiro L, Escoda L, Llorente A. Efficacy of transfusion of platelet concentrates obtained by manual pooling or by semiautomated pooling of buffy-coats: A retrospective analysis of count increment, corrected count increment and transfusion interval. *Vox Sanguinis*. 2009;96: 29–33.
139. Plaza EM, Lozano ML, Guiu IS, Egea JM, Vicente V, De Terán LC, et al. Evaluation of platelet function during extended storage in additive solution, prepared in a new container that allows manual buffy-coat platelet pooling and leucoreduction in the same system. *Blood Transfusion*. 2012;10: 480–489.
140. Sandgren P, Hild M, Sjödin A, Gulliksson H. Storage of buffy-coat-derived platelets in additive solutions: In vitro effects on platelets prepared by the novel TACSI system and stored in plastic containers with different gas permeability. *Vox Sanguinis*. 2010;99: 341–347.
141. Cid J. Automation in blood component preparation methods. In: Blajchman M, Cid J, Lozano M, editors. *Blood Component Preparation: From Benchtop to*

Bedside. Bethesda: American Association of Blood Banks Press; 2011. Pp. 271–286.

142. Larrea L, Ortiz de Salazar MI, Roig R, Soler MA. Fully automated processing of buffy coat-derived pooled concentrates. *Transfusion*. 2005;45: 642; author reply 642–642; author reply 643.

143. Kostelijk EH, Fijnheer R, Nieuwenhuis HK, Gouwerok CW, Korte D de. Soluble P-selectin as parameter for platelet activation during storage. *Thrombosis and Haemostasis*. 1996;76: 1086–1089.

144. Kyrle PA, Hron G, Eichinger S, Wagner O. Circulating P-selectin and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007;97: 880–883.

145. Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, Sato S, Kato T, Naohara T, et al. Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*. 2003;43: 1038–1046.

146. Klüter H, Bubel S, Kirchner H, Wilhelm D. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion*. 1999;39: 1179–1184.

147. Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP. The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunologic Research*. 2009;45: 251–260.

148. Kaufman J, Spinelli SL, Schultz E, Blumberg N, Phipps RP. Release of biologically active CD154 during collection and storage of platelet concentrates prepared for transfusion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5: 788–796.

149. Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*. 2006;108: 2455–2462.

150. Blajchman M. Blood component preparation: From benchtop to bedside. American Association of Blood Banks Press; 2010.
151. Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: Relevance to transfusion medicine. *Vox Sanguinis*. 2005;88: 153–163.
152. Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao K-J, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*. 2005;105: 4106–4114.
153. Triulzi DJ, Assmann SF, Strauss RG, Ness PM, Hess JR, Kaufman RM, et al. The impact of platelet transfusion characteristics on posttransfusion platelet increments and clinical bleeding in patients with hypoproliferative thrombocytopenia. *Blood*. 2012;119: 5553–5562.
154. Van der Planken MG, Vertessen F, Mortelmans E, Van Bockstaele D, Muylle L, Mertens G, et al. The evolution of platelet procoagulant activity of remnant platelets in stored platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma method and the buffy coat method. *Annals of Hematology*. 1999;78: 1–7.
155. Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, Swann I, Ouwehand WH, Goodall AH. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: A comparative flow cytometric study of different production methods. *British Journal of Haematology*. 1997;98: 86–95.
156. Semple E, Bowes-Schmidt A, Yi Q-L, Shimla S, Devine DV. Transfusion reactions: A comparative observational study of blood components produced before and after implementation of semiautomated production from whole blood. *Transfusion*. 2012;52: 2683–2691.
157. Heddle NM, Arnold DM, Boye D, Webert KE, Resz I, Dumont LJ. Comparing the efficacy and safety of apheresis and whole blood-derived platelet transfusions: A systematic review. *Transfusion*. 2008;48: 1447–1458.

158. Singh RP, Marwaha N, Malhotra P, Dash S. Therapeutic efficacy of different types of platelet concentrates in thrombocytopenic patients. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion*. 2008;24: 16–22.
159. Rivera J, Sánchez-Roig MJ, Rosillo MC, Moraleda JM, Vicente V. Stability of glycoproteins Ib/IX and IIb/IIIa during preparation and storage of platelet concentrates: Detection by binding assays with epitope-defined monoclonal antibodies and physiological ligands. *Vox Sanguinis*. 1994;67: 166–171.
160. Plaza EM, Céspedes P, Fernández H, Sánchez-Guiu MI, Egea JM, Vicente V, et al. Quality assessment of buffy-coat-derived leucodepleted platelet concentrates in PAS-plasma, prepared by the OrbiSac or TACSI automated system. *Vox Sanguinis*. 2014;106: 38–44.
161. Bishop JF, Matthews JP, Yuen K, McGrath K, Wolf MM, Szer J. The definition of refractoriness to platelet transfusions. *Transfusion medicine*. 1992;2: 35–41.
162. Bishop JF, McGrath K, Wolf MM, Matthews JP, De Luise T, Holdsworth R, et al. Clinical factors influencing the efficacy of pooled platelet transfusions. *Blood*. 1988;71: 383–387.
163. Bensinger W, Petersen FB, Banaji M, Buckner CD, Clift R, Slichter SJ, et al. Engraftment and transfusion requirements after allogeneic marrow transplantation for patients with acute non-lymphocytic leukemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplantation*. 1989;4: 409–414.
164. Ishida A, Handa M, Wakui M, Okamoto S, Kamakura M, Ikeda Y. Clinical factors influencing posttransfusion platelet increment in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation—a prospective analysis. *Transfusion*. 1998;38: 839–847.
165. Stanworth SJ, Estcourt LJ, Llewelyn CA, Murphy MF, Wood EM, Investigators TS. Impact of prophylactic platelet transfusions on bleeding events

in patients with hematologic malignancies: A subgroup analysis of a randomized trial. *Transfusion*. 2014;54: 2385–2393.

166. Liesveld J, Pawlowski J, Chen R, Hyrien O, Debolt J, Becker M, et al. Clinical factors affecting engraftment and transfusion needs in SCT: A single-center retrospective analysis. *Bone Marrow Transplantation*. 2013;48: 691–697.

167. Böck M, Muggenthaler KH, Schmidt U, Heim MU. Influence of antibiotics on posttransfusion platelet increment. *Transfusion*. 1996;36: 952–954.

168. Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, et al. Rapid platelet-function assay: An automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation*. 1999;99: 620–625.

169. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer*. 1981;47: 207–214.

170. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: A consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2013.

171. Oikawa S, Sasaki D, Kikuchi M, Sawamura Y, Itoh T. Feasibility of a closed-system cell processor (ACP215) for automated preparation of washed platelet concentrates. *Vox Sanguinis*. 2012;102: 110–115.

172. Karafin M, Fuller AK, Savage WJ, King KE, Ness PM, Tobian AAR. The impact of apheresis platelet manipulation on corrected count increment. *Transfusion*. 2012;52: 1221–1227.

Anexo

Quality assessment of buffy-coat-derived leucodepleted platelet concentrates in PAS-plasma, prepared by the OrbiSac or TACSI automated system

E. M. Plaza,¹ P. Cespedes,¹ H. Fernandez,¹ M. I. Sanchez-Guiu,¹ J. M. Egea,² V. Vicente,¹ M. L. Lozano¹ & J. Rivera¹

¹Centro Regional de Hemodonacion, Servicio de Hematología y Oncología Medica, Hospital Universitario Morales Meseguer Universidad de Murcia, Murcia, Spain

²Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario Morales Meseguer Universidad de Murcia, Murcia, Spain

Vox Sanguinis

Background and Objectives Buffy-coat (BC)-derived platelet concentrates (PCs) are the predominant product for platelet transfusion in many countries. Two automated systems, OrbiSac and TACSI, have been introduced in blood centres to prepare these PCs, as an alternative to the manual method. We compared the *in vitro* quality of PCs prepared by both methods during standard storage.

Study Design and Methods Twenty primary BC pools were split into two parts, which were processed with OrbiSac and TACSI system to obtain OrbiSac PCs (O-PCs) and TACSI PCs (T-PCs), respectively. On days 1, 5 and 7 of standard storage, samples were taken and the following analysed: cell count, metabolic variables, platelet function and content of activation and proinflammatory substances.

Results Both the OrbiSac and TACSI systems produced PCs that meet the standards for platelet products in terms of platelet and leucocyte content. *In vitro* evaluation pointed to the similar preservation of platelet metabolism (pH, glucose, bicarbonate and lactate) in O-PCs and T-PCs. Moreover, there were no significant differences between O-PCs and T-PCs as regards the hypotonic shock response or in the platelet aggregation profile. The OrbiSac system caused greater platelet activation, which resulted in higher concentrations of sCD62P, RANTES and sCD40L on the day the PCs were prepared.

Conclusion The systems OrbiSac and TACSI can be used to produce buffy-coat-derived PCs whose cell content, platelet function and metabolism are similar during standard storage. However, the preparation with the OrbiSac system induces a transient increase in platelet activation and release of proinflammatory substances.

Received: 8 May 2013, revised 26

June 2013, accepted 29 June 2013,

published online 28 July 2013

Key words: ORBISAC, platelet concentrates, RANTES, sCD62P, sCD40L, TACSI.

Introduction

The transfusion of platelet concentrates (PCs) is an essential tool in modern medicine, allowing surgery, aggressive chemotherapy schemes and the clinical management of

patients with particular bleeding disorders [1]. These blood products may be selectively obtained from donors by plateletpheresis or prepared from whole blood donations [2, 3]. The use of each of these two products varies between countries and individual institutions, with an approximately 50:50 ratio in Europe. In most developed countries, except USA, the classical platelet-rich-plasma (PRP) method has been substituted by the buffy-coat (BC) procedure as the routine form to prepare whole blood-derived PCs [2]. While PCs prepared by the BC and the

Correspondence: Jose Rivera Pozo, Universidad de Murcia, Centro Regional de Hemodonacion; Ronda de Garay, s/n; 30003-Murcia, Spain

E-mail: jose.rivera@carm.es

MLL and JR contributed equally.

PRP methods are very similar in term of their *in vitro* properties, survival and efficacy upon transfusions [2–5], the BC method has facilitated automatization and new strategies for PCs preparation, including prestorage pool-ing to obtain transfusional PCs doses, universal leucode-pletion and pathogen inactivation.

The original manual BC method is highly labour-demanding, time-consuming and rends products with a limited and variable platelet content [6]. The development a decade ago of the OrbiSac system by Gambro BCT (which is now part of Terumo BCT, Lakewood, CO, USA) was a significant step forward in the BC process. This automated system replaced the manual BC procedure in many blood centres and helped to standardize and opti-mize PC preparation [7, 8]. More recently, Terumo has developed the TACSI system that offers the major advan-tage of automated preparation of six PCs simultaneously. Platelets are known to be affected during preparation and storage under blood banking conditions, in a complex process referred to as platelet storage lesion [9,10]. Several studies have analysed the quality of BC-derived PCs prepared manually and with OrbiSac [11–16], while there is scarce information on PCs prepared with TACSI [17]. The aim of this study was to evaluate the effect of using OrbiSac or TACSI on the *in vitro* quality of PCs during storage under standard conditions for up to 5 days.

Material and methods

Preparation, storage and sampling of platelet concentrates

Standard whole blood units obtained from healthy volun-teer donors were processed to separate plasma, red blood cells and BC units, as detailed elsewhere [16]. The day of whole blood donation was considered the day 0, and frac-tionation of units was performed within 18 h from extraction.

In each of twenty different series of experiments, 10 ABO compatible fresh BC units, having approximately 18–20 h from whole blood donation, and 600 ml of SSP+ platelet additive solution (MacoPharma, Mouvaux, France) were pooled in a large-volume bag (ref.BB*T200BM, Terumo Europe, Leuven Belgium) using a sterile connecting device (TSCD -II, Terumo Europe). Each of these primary BC pools (1157 l – 10 4 ml; Hae-matocrit 22 5 – 0 7%; 874 5 – 82 2 platelets/l; n = 20) were divided into two transfer bags (ref.720433, Laboratorios Grifols S.A, Barcelona, Spain) of similar volume (578 5 – 5 2 ml) containing cells in approximately 30% of plasma and 70% of SSP+. One of the two bags, which was chosen at random, was sterile connected to an OrbiSac BC system platelet processing set (Terumo BCT

ref.50000) and processed with OrbiSac to obtain a leu-codepleted OrbiSac PCs (O-PCs). The second bag of each primary BC pool was sterile connected to a TACSI PI kit (Terumo BCT ref. TF-CSPB3SY02) and processed with the TACSI system for the preparation of leucodepleted TACSI PCs (T-PCs). In both cases, processing was carried out fol-lowing the manufacturer's instructions, except for the addition of SSP+ to the BC pool which was performed manually as indicated above. The platelet storage con-tainers of both the OrbiSac BC and TACSI system are made of n-butryrl, tri n-hexyl citrate (BTHC)-plasticized PVC.

After removing the excess of air and foam, all PCs (O-PCs and T-PCs) were left undisturbed for about 1 h, and then stored for up to 7 days in a standard blood bank PCs incubator set at 22°C and with moderate flat-bed shaking (60 cycles/min.). On days 1, that is the day of preparation of PCs, 5 and 7 of storage, samples (10 ml) were aseptically drawn from the PCs through a sampling injection spike (OriGen Biomedical, Austin, TX, USA) and assayed as described below. All the PCs were tested for sterility by a microbiological culture performed at day 7 which was negative in all cases.

Test and assays

Cell counts and mean platelet volume (MPV) in the PCs samples were determined by means of an electronic parti-cle counter (STKS, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

Residual leucocytes in these leucodepleted PCs were counted by flow cytometry using Leukocount™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) according to the manufac-turer's instructions.

For the platelet functional studies, samples of PCs were centrifuged (1000 g, 10 min), the platelet poor superna-tant removed for later use, and the platelet pellet was gently resuspended in the appropriate volume of identical aliquots of AB fresh-frozen plasma, stored at -80°C and defrosted at 37°C just before use, to obtain a platelet sus-pension containing 300×10^9 platelet/L. Hypotonic shock response (HSR) and platelet aggregation assays in the platelet suspensions obtained from the PCs were per-formed as described previously [16]. The agonists and concentrations used in aggregations were as follows: 1 6 mM arachidonic acid (AA) (DiaMed, Cressier, Switzerland), 25 lM thrombin receptor activating peptide (TRAP) (Sigma-Chemical, Madrid, Spain), 1 25 mg/ml ristocetin (Sigma-Chemical) and 10 lg/ml collagen (Menarini Diag-nostics).

For the rest of experiments, the platelet poor superna-tants obtained were centrifuged again (1500 g, 10 min) to precipitate residual cell fragments. Any impurities were rejected, and the recovered supernatant (PC supernatants)

was stored frozen at -80°C until use to measure meta-bolic parameters and quantify proinflammatory markers.

The pH in the PCs supernatants was measured at 22°C using a pH meter (M220, Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Bicarbonate and lactate levels were determined in an ABL 825 Blood Gas Analyser (Radiometer, Copenhagen, Denmark), and glucose was measured by Advia 1800 Chemistry Analyser (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Finally, the levels of soluble P-Selectin (sCD62P), regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted chemokine (RANTES, also known as CCL5) and soluble CD40 ligand (sCD40L) were measured in the PCs supernatants with the BD™ cytometric bead array (CBA) (Becton Dickinson) and using a BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson) flow cytometer. The specific CBA kits, Human soluble P-Selectin (sCD62P) Flex Set, Human sCD154 (sCD40 ligand) Flex Set and Human RANTES Flex Set, were used following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The results of the different variables measured in the PCs are presented as mean – standard deviation. The Kolmogorov–Smirnov test was used to check for the normal distribution of data. Differences among variables between O-PCs and T-PCs at each storage day were assessed using a paired t-Student's test or the Wilcoxon test, as appropriate. P-values of <0.05 were accepted as statistically significant. For each group of PCs (O-PCs or T-PCs), any changes in variables occurring during storage were analysed by means of a one-way ANOVA for repeated measures and Bonferroni correction test. These statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics version 15.0 for Windows (IBM Corporation, New York, USA).

Results

Volume and cell content of PCs

The general properties of the PCs are summarized in Table 1. As shown, the volume of the O-PCs was about 30 ml greater than that of the T-PCs. Both processing systems, that is OrbiSac and TACSI, provided approximately 80% recovery in the PCs of the platelets contained in the primary pools of BC. Consequently, the total platelet content in O-PCs and T-PCs was very similar, although platelet density was slightly but significantly higher in T-PCs (Table 1). Of interest is the fact that the platelets in T-PCs showed a higher MPV than the platelets in O-PCs, a difference that remained significant throughout storage. Finally, there was no significant difference between O-PCs and T-PCs as regards the total amount of contam-

Table 1 Characteristics of the platelet concentrates (PCs) obtained with the OrbiSac (O-PCs) and TACSI (T-PCs) systems, from homologous pools of identical ABO buffy-coat units suspended in SSP+ (70%) and plasma (30%)

	O-PCs	T-PCs
Volume (ml)	380 7– 6 9	349 9– 8 7*
Platelets (910^9 /unit)	351 9– 39 9	360 6– 33 5
(910^9 /l)	925 1– 109 6	1031 7– 104 2*
MPV (fl)	6 65– 0 43	6 89– 0 40*
Recovery (%) Leucocytes	80 5– 9 8	82 4– 6 7
(910^6 /unit)	0 04– 0 05	0 03– 0 04

MPV, mean platelet volume.

All values are mean – SD from 20 different units.

*Denotes $P < 0.01$ with respect to O-PCs according to paired t-test.

inating leucocytes (Table 1). The highest contamination was 0.192×10^6 and 0.153×10^6 leucocytes in O-PCs and T-PCs, respectively.

Metabolic parameters and functional assays

The metabolic behaviour of the homologous PCs obtained from buffy-coat pools in plasma SSP+ by means of the OrbiSac (O-PCs) or with TACSI (T-PCs) system was evaluated during storage by measuring the pH and the concentrations of glucose, bicarbonate and lactate in the respective PC supernatants. As shown in Table 2, the pH remained around 7.2 in all the PCs throughout the storage period. As expected for these platelet products, both glucose and bicarbonate gradually decreased during storage, while the lactate level increased steadily to about 12 mM on day 7. All these metabolic parameters changed to a similar extent in O-PCs and T-PCs during storage. However, slight differences (statistically significant but probably meaningless from a functional point of view) were determined between T-PCs and O-PCs regarding these parameters, especially on the day of preparation (day 1) (Table 2).

Platelet functional status

To compare the platelet functional status in O-PCs and T-PC during standard storage, HSR and aggregometry experiments were carried out. The HSR assays demonstrated that the capacity of platelets to recover shape after hypotonic stress during storage remained good (above 80%) and similar in O-PCs and T-PCs (Table 2). Figure 1 displays the changes in the platelet aggregation profile of these PCs. On day 1, the maximum platelet aggregation

Table 2 Evolution during 7 days of storage of platelet metabolism parameters and hypotonic shock response (HSR) in homologous platelet concentrates (PCs) obtained with OrbiSac (O-PCs) or with TACSI (T-PCs) systems, from pools of identical ABO buffy-coat units suspended in SSP+ (70%) and plasma (30%)

Parameter	Day 1		Day 5		Day 7	
	O-PCs	T-PCs	O-PCs	T-PCs	O-PCs	T-PCs
pH	7.20–0.04	7.23–0.05*	7.30–0.07#	7.33–0.07#	7.24–0.10	7.27–0.10*
Glucose mg/dl	149.6–9.0	154.2–6.5*	102.9–11.5#	101.1–10.0#	76.2–21.3#	70.8–19.5#
Bicarbonate (mM)	7.28–0.53	7.76–0.40*	6.56–0.85#	6.84–1.42#	5.65–1.15#	5.78–0.83#
Lactate (mM)	5.02–0.95	4.62–0.51*	9.71–1.57#	9.34–2.12#	11.35–2.67#	12.06–2.19#
HSR (%)	95.6–11.0	99.7–15.7	86.3–8.7#	88.6–9.6#	87.7–14.2	83.8–10.5#

Values are mean – standard deviation from 20 different PCs. A paired t-test was used to compare values.

*Denotes P < 0.05 with respect to O-PC on each day of storage.

#Denotes P < 0.05 with respect to Day 1 in each type of PCs (O-PC or T-PCs).

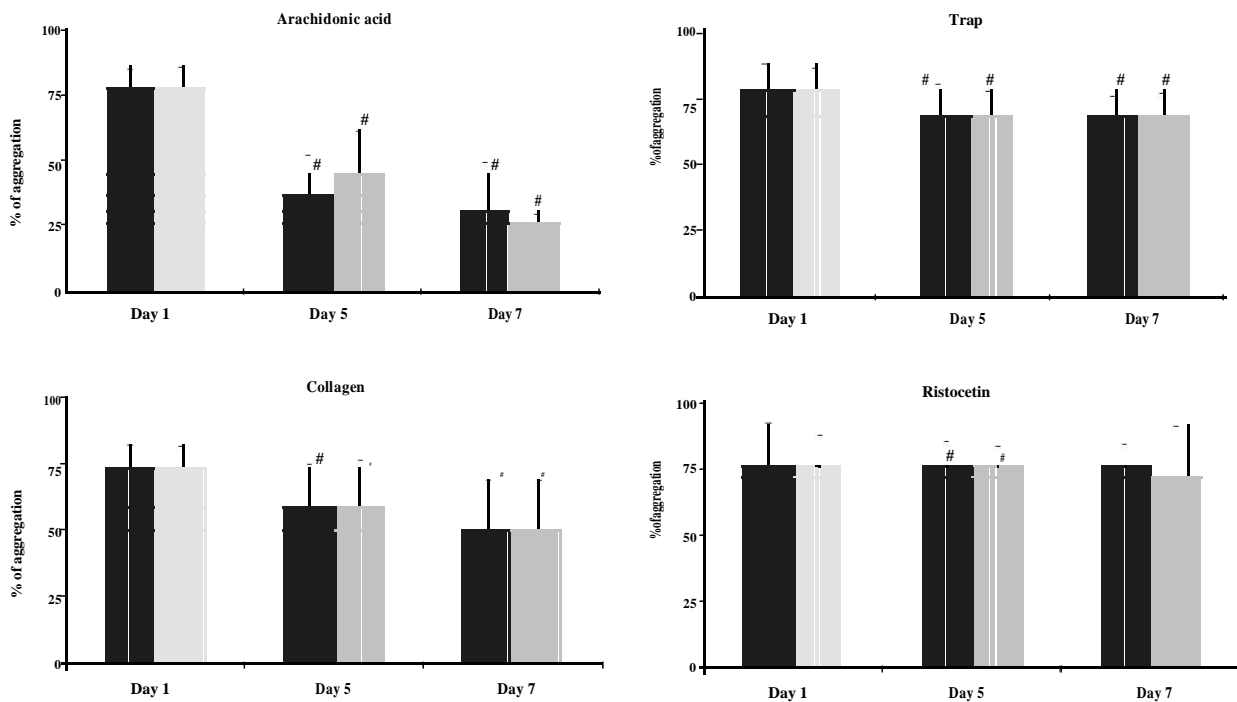


Fig. 1 Profile of platelet aggregation response in homologous platelet concentrates (PCs) obtained with OrbiSac (O-PCs) or TACSI (T-PCs) during 7 days of storage. Homologous PCs were obtained with OrbiSac (O-PCs) (■) or with TACSI (T-PCs) (□) systems from the same pools of identical ABO buffy-coat units suspended in SSP+ (70%) and plasma (30%). At days 1, 5 and 7 of storage under standard blood bank conditions, samples of the PCs were collected, the PCs supernatants were removed, and the platelets were resuspended in AB plasma at 300.9×10^9 cells/l. As described in Material and Methods, platelet aggregation was induced with 1.6 mM arachidonic acid, 25 μM TRAP, 10 μg/ml collagen and 1.25 mg/ml ristocetin, and measured as maximal change in light transmission. All data in the plots are the mean – standard deviation from 20 experiments. # Denotes P < 0.05 with respect to day 1 in each type of PCs (O-PC or T-PCs).

values with each of the four agonists tested were above 70% in both O-PCs and T-PCs, and close to the normal aggregation response of healthy subjects with these doses of agonists (not shown). This aggregation response of PCs gradually decreased as storage progressed, more abruptly

in the case of the less potent agonists collagen and arachidonic acid. Importantly, no significant differences were observed between O-PCs and T-PCs in the aggregation response to any of the agonists at any stage during storage (Fig. 1).

Mediators of inflammation in supernatants

Table 3 summarizes the evolution of activation/proinflammatory markers in the PCs during storage. Of note was the fact that on the day of preparation (day 1), the concentrations of sCD62P, RANTES and sCD40L were slightly but significantly higher in O-PCs than in their homologous T-PCs. As shown in Table 3, this difference decreased as storage proceeded; the concentration of these bioactive compound reaching similar level in both types of PC on day 7.

Discussion

Because the preparation of PCs from BCs is a laborious task that requires multiple steps, semi-automatic systems such as OrbiSac and TACSI have increasingly been introduced in blood centres during the last decade, providing benefits in term of organization and the quality of PCs [18, 19].

Some studies have shown that PCs prepared with Orbi-Sac have a higher platelet content and better conserve the aerobic metabolism of platelets, compared with those prepared manually. In contrast, OrbiSac seems to induce slightly higher platelet activation than manual processing [8,11–13, 20]. This finding was attributed to the higher shear stress affecting platelets during automatic processing and may be of some concern, even if it has no clinical relevance [12, 13].

To the best of our knowledge, only one comparison of BC-derived PCs prepared with OrbiSac or TACSI has been reported [17]. In this work, Sandgren et al. compared homologous PCs prepared with TACSI but stored in two different types of PVC container (differing in the plasticizer) and used nonhomologous PCs prepared with OrbiSac as a reference group. They found no significant variations between the groups regarding platelet content and MPV, and noted slight differences during storage in metabolic, function and activation parameters

between PCs prepared with TACSI and those obtained with OrbiSac [17].

In contrast to the previous study [17], our current work was designed to confirm that any potential differences between O-PCs and T-PCs during 7 days of storage are independent of the platelet source. Thus, high-volume BC pools were divided into half, and each part was processed with TACSI or OrbiSac to produce homologous PCs, which were then stored together under standard blood bank conditions. Platelet recovery (>80%) was almost identical with the two systems, and both devices rendered PCs ($>3 \times 10^{11}$ platelets, $<10^6$ leucocytes, pH 7.2) that easily meet European standards for these blood products [21]. Moreover, there were negligible differences in term of metabolic (pH, glucose consumption, bicarbonate and lactate levels) and functional (HSR, aggregation response) parameters between O-PCs and T-PCs. All the parameters for both types of PCs displayed a similar degree of impairment during storage to that we previously found in manually prepared BC-derived PCs [16].

The most noticeable finding in this study refers to the activation and proinflammatory markers released by these O-PCs and T-PCs, which have not been previously compared.

The platelet surface expression of P-selectin (CD62P) is an established marker of platelet activation during the storage of PCs [9]. Soluble CD62P is released by proteolytic cleavage of CD62P, and it may be a risk factor for venous thromboembolism [22, 23]. The proinflammatory C-C chemokine RANTES is also released as a result of platelet activation during processing and storage of PCs, and the passive transfusion of RANTES in PCs might be associated with inflammatory reactions as well as allergic reactions [24, 25]. As regards sCD40L, which is thought to be mainly derived from platelets [26], its accumulation in PCs may favour febrile reactions due to the induction of cyclooxygenase-2 expression and TRALI by promoting the activation of polymorphonuclear leucocytes and endothelial damage [27, 28].

Table 3 Changes in the pro-inflammatory profile, during 7 days of storage, in homologous platelet concentrates (PCs) obtained with OrbiSac (O-PCs) or with TACSI (T-PCs) systems, from the same pools of identical ABO buffy-coat units suspended in SSP+ (70%) and plasma (30%)

Parameter	Day 1		Day 5		Day 7	
	O-PCs	T-PCs	O-PCs	T-PCs	O-PCs	T-PCs
sCD62 (mg/ml)	28.77–7.88	21.47–6.23*	46.77–7.41 [#]	45.35–4.44 [#]	46.29–8.71 [#]	45.00–4.09 [#]
RANTES (mg/ml)	22.70–12.14	16.63–6.14*	58.87–3.95 [#]	61.80–4.49* [#]	62.49–3.29 [#]	64.04–1.18 [#]
sCD40L (mg/ml)	1.24–0.76	0.63–0.33*	3.70–1.05 [#]	4.24–1.01* [#]	4.18–1.50 [#]	4.61–0.79 [#]

Values are mean – standard deviation from 20 different PCs. Paired t-test or Wilcoxon test, as appropriate, was used to compare values.

*Denotes $P < 0.05$ with respect to O-PC on each day of storage.

[#]Denotes $P < 0.05$ with respect to Day 1 in each type of PCs (O-PC or T-PCs).

Interestingly, we found that T-PCs contain significantly lower levels of sCD62, RANTES and sCD40L on the day of preparation, although this difference disappeared as storage progressed. Thus, it seems that processing BC pools with the OrbiSac system induces slightly higher platelet activation than processing with TACSI, although this is a transient phenomenon which evens out during storage. Because most PCs are transfused before day 3 of storage, at least in our centre, reduced amounts of these platelet-derived biological response modifiers may represent an advantage of T-PC over O-PCs.

Worth mentioning is the finding that the levels of sCD62P, RANTES and sCD40L in the PCs following semi-automatic preparation with either OrbiSac or TACSI were slightly but significantly higher than those recently determined in platelet PCs obtained manually [16]. This finding reflects that of Vetlesen et al. [13], who also observed higher platelet activation and RANTES accumulation in PCs prepared with OrbiSac in comparison with units prepared manually.

In conclusion, our evaluation of the processing of homologous platelets with TACSI and OrbiSac suggests

that, under controlled conditions, the two methods of production of BC-derived PCs are equivalent in terms of cell recovery and the preservation of *in vitro* platelet function and metabolism during storage. Compared with TACSI, the OrbiSac system seems to expose platelets to mechanical stress, resulting in transiently higher concentrations of platelet-derived proinflammatory substances in the PCs. Given the vast experience in the transfusion of PCs prepared with OrbiSac, this difference is most likely to be of no clinical relevance.

Acknowledgements

Research of the authors' group is funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, PI10/02594), RECAVA RD12/0042/0050 (ISCIII and FEDER) and Fundacion Seneca (07703/GERM/07). ISG has a fellowship from ISCIII (FI10/00535).

Conflict of interest statement

This study was sponsored by Terumo Europe España SL.

References





- 1 Heal JM, Blumberg N: Optimizing platelet transfusion therapy. *Blood Rev* 2004; 18:149–165
- 2 Vassallo RR, Murphy S: A critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol* 2006; 13:323–330
- 3 Lozano ML, Rivera J, Vicente V: Platelet concentrates from whole-blood donations (buffy-coat) or apheresis: which one to use? *Med Clin (Barc)* 2012; 138:528–533
- 4 Lozano M, Estebanell E, Cid J, et al.: Platelet concentrates prepared and stored under currently optimal conditions: minor impact on platelet adhesive and cohesive functions after storage. *Transfusion* 1999; 39:951–959
- 5 Anderson NA, Gray S, Coppstone JA, et al.: A prospective randomized study of three types of platelet concentrates in patients with haematological malignancy: corrected platelet increments and frequency of nonhaemolytic febrile transfusion reactions. *Transfus Med* 1997; 7:33–39
- 6 Pietersz RN, Reesink HW, Dekker WJ, et al.: Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. I. Special inserts for centrifuge cups. *Vox Sang* 1987; 53:203–207
- 7 Gulliksson H, Sjödin A, Sandgren P, et al.: Automated preparation of platelet concentrates from pooled buffy coats using the Gambro OrbiSac system. *Transfus Apher Sci* 2003; 29:11–12
- 8 Janetzko K, Klüter H, van Waeg G, et al.: Fully automated processing of buffy-coat-derived pooled platelet concentrates. *Transfusion* 2004; 44: 1052–1058
- 9 Rivera J, Lozano ML, Vicente V: In vitro changes of platelet parameters: lessons from blood banking. *Methods Mol Biol* 2004; 273:57–72
- 10 Thon JN, Schubert P, Devine DV: Platelet storage lesion: a new understanding from a proteomic perspective. *Transfus Med Rev* 2008; 22:268–279
- 11 Larsson S, Sandgren P, Sjödin A, et al.: Automated preparation of platelet concentrates from pooled buffy coats: in vitro studies and experiences with the OrbiSac system. *Transfusion* 2005; 45:743–751
- 12 Larrea Gonzalez L, Ortiz de Salazar MI, Roig R, et al.: Platelet activation during storage of platelet concentrates processed from buffy coats by the automated OrbiSac system. *Transfusion* 2007; 47:1555–1556
- 13 Vetlesen A, Mirlashari MR, Ezligini F, et al.: Evaluation of platelet activation and cytokine release during storage of platelet concentrates processed from buffy coats either manually or by the automated OrbiSac system. *Transfusion* 2007; 47:126–132
- 14 Dijkstra-Tiekstra MJ, Kuipers W, Sestroikromo AC, et al.: Platelet capacity of various platelet pooling systems for buffy coat-derived platelet concentrates. *Transfusion* 2008; 48:2114–2121
- 15 Cid J, Ramiro L, Escoda L, et al.: Efficacy of transfusion of platelet concentrates obtained by manual pooling or by semiautomated pooling of buffy-coats: a retrospective analysis of count increment, corrected count increment and transfusion interval. *Vox Sang* 2009; 96:29–33
- 16 Plaza EM, Lozano ML, Guiu IS, et al.: Evaluation of platelet function during extended storage in additive solution, prepared in a new container that allows manual buffy-coat platelet pooling and leucoreduction in the same system. *Blood Transfus* 2012; 10:480–489

2013 International Society of Blood Transfusion
Vox Sanguinis (2014) 106, 38–44

- 17 Sandgren P, Hild M, Sjödin A, et al.: Storage of Buffy-coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects on platelets prepared by the novel TACSI system and stored in plastic containers with different gas permeability. *Vox Sang* 2010; 99:341–347
- 18 Chicchi R, Biguzzi R, Santarelli R: The OrbiSac system: results and organizational impact. *Blood Transfus* 2007; 5:15–19
- 19 Cid J: Automation in blood component preparation methods; in: Blajchman M, Cid J, Lozano M (eds): *Blood Component Preparation: From Benchtop to Bedside*. Bethesda, AABB Press, 2011:271–286
- 20 Larrea L, Ortiz de Salazar MI, Roig R, et al.: Fully automated processing of buffy coat-derived pooled concentrates. *Transfusion* 2005; 45:642–643
- 21 Council of Europe-European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM): *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*. (16th edn). ISBN 978-92-871-7022-4. Strasbourg, France, Council of Europe Pub, 2011
- 22 Kostelijk EH, Fijnheer R, Nieuwenhuis HK, et al.: Soluble P-selectin as parameter for platelet activation during storage. *Thromb Haemost* 1996; 76:1086–1089
- 23 Kyrle PA, Hron G, Eichinger S, et al.: Circulating P-selectin and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2007; 97:880–883
- 24 Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, et al.: Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 2003; 43:1038–1046
- 25 Klüter H, Bubel S, Kirchner H, et al.: Febrile and allergic transfusion reaction after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion* 1999; 39:1179–1184
- 26 Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, et al.: The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immuno-modulation. *Immunol Res* 2009; 45: 251–260
- 27 Kaufman J, Spinelli SL, Schultz E, et al.: Release of biologically active CD154 during collection and storage of platelet concentrates prepared for transfusion. *J Thromb Haemost* 2007; 5:788–796
- 28 Khan SY, Kelher MR, Heal JM, et al.: Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* 2006; 108:2455–2462



Comparative assessment of prophylactic transfusions of platelet concentrates obtained by the PRP or buffy-coat methods, in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Hermógenes Fernández-Muñoz ^{a,b}, Eva M. Plaza^a, José Miguel Rivera-Caravaca ^a, María José Candela^a, Marta Romera^{a,c}, Felipe De Arriba^a, María L. Lozano ^a, Vicente Vicente^a, Inmaculada Heras^a, Cristina Castilla-Llorente^{a,d} and José Rivera ^a

^aServicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, CIBERER, IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain; ^bServicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Rafael Méndez, Lorca, Spain; ^cServicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Santa Lucía, Cartagena, Spain; ^dService d' Hématologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

ABSTRACT

Objectives: Whole blood-derived platelet concentrates can be obtained by the platelet-rich plasma (PRP-PCs) or the buffy-coat (BC-PCs) method. Few studies have shown that BC-PCs display lower in vitro platelet activation, but scarce information exists regarding transfusion efficacy. We have performed a retrospective study assessing platelet transfusion in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT) in our clinic, before and after the implementation of BC-PCs.

Methods: We reviewed clinical records corresponding to 70 PRP-PCs and 86 BC-PCs prophylactic transfusions, which were performed to 55 AHCT patients. Transfusion efficacy was assessed by the 24-h post-transfusion corrected count increment (24-h CCI) and bleeding events. Clinical factors affecting transfusion outcome were also investigated.

Results: Clinical characteristics and the total number of platelet transfusions were similar among groups. Mean donor exposure was 5.8 and 5.0 in each single PRP-PCs and BC-PCs transfusion, respectively ($p < 0.01$). The 24-h CCI was significantly higher in patients transfused with BC-PCs than in those receiving PRP-PCs (8.3[2.7–13.4] vs. 4.7[1.3–8.1]; $p < 0.01$). Independent predictors of poor platelet transfusion response included diagnosis other than acute leukemia (HR 8.30; 95% CI 1.96–35.22; $p = 0.004$), splenomegaly (HR 8.75; 95% CI 2.77–27.60; $p < 0.001$), graft versus host disease prophylaxis different from cyclosporine A and methotrexate (HR 3.96; 95% CI 1.55–10.14; $p = 0.004$) and PRP-PCs transfusion (HR 4.54; 95% CI 1.72–12.01; $p = 0.002$). There were no differences between both groups regarding the bleeding events.

Conclusion: In the AHCT setting, we hypothesize that BC-PCs transfusion, when compared to PRP-PCs, results in higher CCI and reduced donor exposure, but provides no significant benefit regarding bleeding outcome.

KEYWORDS

Buffy-coat; platelet-rich plasma; correct count increment; platelet transfusion; allogeneic hematopoietic cell transplant; whole blood derived platelets; platelet concentrates; bleeding outcomes


Introduction

Patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplants (AHCT) experience a high risk of bleeding complications secondary to the chemotherapy-induced thrombocytopenia. Although the correct transfusion practice after AHCT is still controversial [1], most platelet transfusions in this clinical setting are prophylactic, aiming to increase the low platelet counts and to reduce the risk of bleeding. The Platelet Dose Study (PLADO) has shown that low-dose prophylactic platelet transfusions could reduce total platelet utilization without increasing the risk of grade ≥ 2 bleeding [2]. In contrast, the Trial of Prophylactic Platelet Transfusions (TOPPS) has suggested that a strategy of therapeutic platelet transfusion, i.e. transfusion only

in case of bleeding, might become a new standard of care in selected patients [3].

While those issues, low vs. high dose or prophylactic vs. therapeutic platelet transfusion, are currently under debate and investigation, little is known regarding the impact of the type of platelets being transfused in this clinical setting. Nowadays, the respective use of PCs and apheresis platelets (AF-PCs) is highly hetero-geneous, ranging from 10% to 98% PCs [4]. Whereas the Netherlands or Sweden uses buffy-coat derived platelet concentrates (BC-PCs) as standard platelet product for patient care, the UK or France applies AF-PCs [5]. To our knowledge, randomized clinical trials evaluating platelet transfusion outcomes have included mainly apheresis platelets, whereas studies

CONTACT José Rivera  jose.rivera@carm.es  Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, Ronda de Garay s/n, Murcia 30003, Spain

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1455434>

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

2 H. FERNÁNDEZ-MUÑOZ ET AL.

evaluating whole blood-derived platelets (WBDP) products are scarce [2,3].

It is long known that platelets undergo various changes from blood collection, and during processing and blood banking storage, collectively referred to as platelet storage lesion (PSL) [6]. These *ex vivo* changes in platelets, as well as the patient's clinical conditions, may affect the therapeutic benefit of platelet transfusion [7–9]. In the 1990s an *in vitro* study showed that BC-PCs undergo less PSL than PRP-PCs [10]. Metcalfe et al. also found that processing-induced platelet activation was lower in BC-PCs than in PRP-PCs [11]. So far, few comparative studies have shown negligible differences in transfusion efficacy between these two platelet products [12–14]. Regarding safety issues, PRP-PCs have displayed a higher bacterial contamination risk, compared to BC or AF-PCs [15].

In the current investigation, we have retrospectively compared the outcome of prophylactic platelet transfusions with either BC-PCs or PRP-PCs in a series of patients undergoing AHCT.

Materials and methods

Patients

A series of 55 consecutive patients underwent AHCT in our Hematology Unit at the Morales Meseguer University Hospital, between January 2005 and February 2011. Until February 2008, patients were transfused, if required, with PRP-PCs or single-donor apheresis platelets (AF-PCs). Then, PRP-PCs production was discontinued by the local blood transfusion center. From March 2008, AHCT patients received, if needed, AF-PCs or BC-PCs.

This investigation followed the principles of the Helsinki Declaration and had been approved by the hospital Ethics Committee. Patients had provided consent for using their medical records for research purposes.

For the aim of the study, these patients were classified into two groups according to the type of prophylactic WBDP product being transfused, i.e. PRP-PCs and BC-PCs. Patients in both groups could also receive AF-PCs during post-AHCT clinical management, depending on the availability of platelet products in the blood transfusion center. In these series of AHCT patients, platelet engraftment was defined as the first of three consecutive days with a platelet count $>20 \times 10^9/L$ without transfusion, or the second day of three days with a platelet count higher than $20 \times 10^9/L$ after a platelet transfusion. Neutrophil engraftment was considered as the first day of three consecutive days with an absolute count $>0.5 \times 10^9/L$. According to the criteria established in our Clinical Unit, prophylactic platelet support was given to patients with platelet counts in the daily morning count of less than $10 \times$

$10^9/L$, or less than $20 \times 10^9/L$ under particular clinical conditions, such as fever or sepsis, at the physician decision.

Platelet transfusions in these patients were not considered in the study according to the following exclusion criteria: therapeutic transfusion in the context of grade ≥ 2 bleeding according to the World Health Organization (WHO scale); prophylactic transfusion given with a threshold higher $20 \times 10^9/L$; multiple platelet transfusions on the same day; transfusion in the presence of thrombotic thrombocytopenic purpura or the hemolytic-uremic syndrome.

Patient bleeding complications following AHCT were assessed by reviewing medical daily records. Bleeding diathesis in patients was graded by two independent investigators, and a third in case of discrepancy, according to the WHO bleeding Scale as used in the PLADO trial [2].

Platelet concentrates preparation

Whole blood samples (450 ± 50 mL) from regular blood donors were collected into licensed triple bag systems (Terumo BCT, Zaventem, Belgium; Laboratorios Grifols SA, Barcelona, Spain), with a primary pack containing 63 mL of CPD anticoagulant.

WBDP individual units were obtained by PRP method as described [16], and stored under standard blood bank conditions ($20\text{--}24^\circ\text{C}$, 60 cycles/min) for up to five days. PRP-PCs transfusion units were prepared immediately before transfusion by pooling of individual ABO-identical PRP-platelet units based on the patient's weight. All PRP-PCs were leukodepleted by filtration at bedside at time of transfusion.

Leukodepleted BC-PCs transfusion units, in plasma (35%) and platelet additive solution (65%) (SSP+, MacoPharma-MacoSpania, Madrid, Spain) were obtained from whole blood units by the BC procedure, as detailed elsewhere [17]. BC-PCs were stored as above until transfusion within five days from preparation.

Leukodepleted AF-PCs transfusion units were obtained directly from donors using TRIMA or COBE Spectra apheresis devices (Terumo BCT) according to the manufacturer's instructions. Our standard apheresis procedure did not change during the study period (January 2005 to February 2011).

The general characteristics of the patients as well as the properties of the platelet transfusion units which may affect platelet transfusion were recorded at patient the medical history and the Blood Center database, respectively, and are summarized in Tables 1 and 1S.

Platelets transfusion assessment

The primary endpoints of the study were post-transfusion platelet increment (PPI) and correct count increment (CCI), as previously defined [18]. The platelet

number in the transfused units was not available. Therefore, we used the mean platelet number reported by the blood transfusion center in the quality assessment of PCs performed at the corresponding time. The 24-h CCI cutoff for platelet refractoriness was set at 4500 [13].

Secondary outcomes included the percentage of patients who had bleeding events of WHO grade ≥ 2 , death from hemorrhage, total number of platelet transfusions, prophylactic transfusion intervals and time from the first transfusion to bleeding grade ≥ 2 . Patients' follow up concluded when they achieved platelet engraftment ($\geq 20 \times 10^9/L$), at hospital discharge or at death, whichever occurred first.

Statistical analysis

Given the retrospective and observational design of this study, we have not performed any sample size calculation. Continuous variables were tested for normal distribution by the Kolmogorov–Smirnov test. Categorical variables are presented as a percentage and continuous variables as median (interquartile range). Chi-square or Fisher's exact test for qualitative variables and T-student or U test and correlation analyses for quantitative were performed, as appropriate, to evaluate differences in patient's characteristics and to check for the potential effect of patient and/or PCs characteristics on 24-h CCI. The independent effect of clinical variables on the platelet transfusion response was calculated using a Cox proportional hazards regression model, incorporating in the multivariate model only those variables that showed a p value < 0.15 in the univariate analysis. Statistical significance was established at p values < 0.05 . All statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 for Windows software.

Results

Patient general characteristics

During the study period, 330 platelet transfusions were performed to 74 patients who underwent AHCT. Among these, 123 were excluded as they were therapeutic transfusions. Fifty-one prophylactic AF-PCs transfusions were evaluated separately (see Table 2S). The remaining 156 analyzed transfusions corresponded to 70 PRP-PCs transfusions to 27 patients, and 86 BC-PCs units that were transfused to 28 patients.

The general clinical conditions of these 55 patients as well as their transplant characteristics are summarized in Table 1S. As shown, no statistically significant differences between both groups were observed regarding patient characteristics, underlying disease, or the transplant peculiarities. Both groups behaved similarly in terms of neutrophil and platelet engraftment (Table 1S). All patients received hepatic

sinusoidal obstructive syndrome prophylaxis with low molecular weight heparin, and none of them developed clinical signs of this complication. The number of sepsis episodes was similar in both groups. Concomitant treatment with amphotericin B and platelet transfusion did not take place in the PRP-PCs group, but occurred in 12% of the cases in the BC-PCs group. Remarkably, red blood cell transfusions (RBCT) were significantly less frequent in the PRP-PCs group than in the BC-PCs group (median 4 vs. 6, $p = 0.025$).

Platelet concentrates properties and platelet transfusion efficacy

The estimated platelet contents of the PRP-PCs before bedside filtration, and leukodepleted BC-PCs transfused to the patients were 3.90 ± 0.47 and $3.85 \pm 0.18 \times 10^{11}$, respectively ($p = 0.33$). BC-PCs were stored before transfusion for slightly shorter times than PRP-PCs (3.49 ± 1.13 days vs. 3.93 ± 1.01 days, $p < 0.02$). In addition, the mean number of donors involved in each platelet transfusion unit was significantly lower in BC-PCs when compared to the PRP-PCs (5.01 ± 0.19 vs. 5.76 ± 0.53 donors, respectively; $p < 0.01$).

Regarding the AF-PCs transfused to patients, no major changes took place in their collection and processing during the study period. These leukocyte depleted AF-PC averaged $3.39 \pm 1.16 \times 10^{11}$ platelets per unit. Moreover, the mean storage time of AF-PCs before transfusion was similar in patients from the PRP-PCs and the BC-PCs groups (3.65 ± 1.27 days vs. 3.03 ± 1.17 days, respectively; $p = 0.08$).

Overall, patients in either group received a median of three platelet transfusions during the engraftment period. Importantly, there were no statistical differences in the proportion of AF-PCs and whole blood-derived PCs that were transfused to either group of patients (see Table 1).

Table 1. Total platelet transfusion and efficacy of WBDP transfusions in both patient groups.

Parameter	PRP-PCs n = 27	BC-PCs n = 28	p Value
Total platelet transfusions	90	117	
Platelet type			
WBDP	70(78)	86(73.5)	0.27
Apheresis	20(22)	31(26.5)	
Platelet transfusion per Patient	2(2–4)	3(1.3–6.8)	0.44
WBDP transfusion efficacy assessment			
Pre-transfusion platelet count ($\times 10^9/L$)	13(11–16)	14(11–17)	0.35
24-h Post-transfusion platelet count ($\times 10^9/L$)	22.5(16.8–32)	31.5(21–42)	0.024*
24-h platelets increment ($\times 10^9/L$)	9(3–19)	18(7–26.3)	0.032
24-h CCI ($\times 10^9/L$)	4.75(1.2–8.4)	8.7(3–13.5)	$< 0.01^*$
$> 4.5 \times 10^9/L$ 24-h CCI – % of transfusion	37(53)	60(70)	$< 0.05^*$
Days until next transfusion	1.9(1–3)	2(1.5–3)	0.6

Note: All values are shown as median and interquartile range or absolute number and percentage.

* $p < 0.05$ with respect to PRP-PCs group.

Table 2. Factors associated with a poor response, i.e. lower 24 CCI, to platelet transfusion.

	Univariate analysis HR (95% CI); p	Multivariate analysis HR (95% CI); p
Patient related		
Female gender	3.78 (1.91–7.49); p < 0.001	1.90 (0.68–5.23); p = 0.216
Age > 43 years	1.03 (1.01–1.06); p = 0.003	1.03 (0.99–1.06); p = 0.143
Splenomegaly	4.32 (1.90–9.84); p < 0.001	8.75 (2.77–27.60); p < 0.001*
Diagnosis different from AL	13.67 (4.00–46.73); p < 0.001	8.30 (1.96–35.22); p = 0.004*
BM stem cells source	2.91 (1.24–6.81); p = 0.014	1.45 (0.40–5.41); p = 0.577
Reduced intensity conditioning regimen	5.21 (2.37–11.46); p < 0.001	2.15 (0.62–7.50); p = 0.230
Prophylaxis different from CsA-MTX	2.64 (1.34–5.20); p = 0.005	3.96 (1.55–10.14); p = 0.004*
Mucositis grade \leq 2	2.21 (0.92–5.30); p = 0.075	2.63 (0.68–10.27); p = 0.163
Product related		
PRP-PCs transfusión	2.06 (1.07–3.97); p = 0.031	4.54 (1.72–12.01); p = 0.002*

Note: HR = hazard ratio; CI = confidence interval.

*p < 0.05 with respect to PRP-PCs group.

As summarized in Table 1, both PPI and CCI were approximately 2-fold higher in the BC-PCs than in PRP-PCs transfusion group. Moreover, the percentage of inefficient platelet transfusions, i.e. 24-h CCI < 4500, was significantly lower in patients receiving BC-PCs. In contrast, we found no significant differences between the two groups in the efficacy of apheresis platelet transfusion (Table 2S). We observed a similar time to next transfusion in both groups (Table 1).

Univariate analysis revealed that factors statistically associated with lower 24-h CCI included female gender, age older than 43-year-old, PRP-PCs transfusion and several clinical variables (Table 2). In contrast, in this series of transfusions, hepatomegaly, ABO compatibility, PCs storage time and patient body surface area had negligible effect in CCI-24-h (data not shown). In the Cox regression multivariate analysis, variables that remained independently associated with poor platelet transfusion response included diagnosis different from acute leukemia (AL) (HR 8.30; 95% CI 1.96–35.22; p = 0.004), splenomegaly (HR 8.75; 95% CI 2.77–27.60; p < 0.001), GvHD prophylaxis different from CsA and MTX (HR 3.96; 95% CI 1.55–10.14; p = 0.004) and PRP-PCs transfusion (HR 4.54; 95% CI 1.72–12.01; p = 0.002; Table 2).

On secondary analysis, we evaluated the influence of the type of PCs on patient bleeding and transfusion interval. Here, 25 patients corresponding to PRP-PCs group and 27 to BC-PCs were available for analysis. As shown in Table 3, bleeding grade \geq 2 occurred in 23% of the patients, with slightly higher incidence among those of the PRP-PCs group (8[32%] [5 bleeding grade 2 and 3 grade 3] vs. 4[15%] [3 bleeding grade 2

and 1 grade 4] in the BC-PCs group). Gastrointestinal bleeding was the most common bleeding complication among PRP-PCs patients (62.5% of the patients), followed by urinary, gynecological and cutaneous bleeding (12.5% each). In contrast, epistaxis was the most frequent bleeding in the BC-PCs group (50%), followed by gastrointestinal and urinary bleeding (25% each). Overall, cutaneous bleeding was the most common mild bleeding event (64% of bleeding grade 1), without differences between PRP-PCs and BC-PCs groups. One patient in the BC-PCs displayed refractoriness to multiple transfusions and died from generalized bleeding (intracranial, hematuria, pulmonary hemorrhage, etc.), before a specific HLA/HPA typed apheresis platelet transfusion protocol could be established.

Finally, the time interval from the first transfusion to first bleeding grade \geq 2 episode, was similar in both patient groups (Table 3).

Discussion

Although the preparation of WBDP by the BC method has widely substituted the PRP procedure worldwide, to date few studies have compared transfusion outcome of BC-PCs and PRP-PCs [13,14,19]. Prospective studies approaching this comparison will unlikely to be made nowadays, since the production of PRP-PCs has already been abandoned in most developed countries.

Previously, Anderson et al., 'in the pre universal leukoreduction era', have reported that the use BC-PCs, vs. PRP-PCs, was associated with slightly, but not significantly, higher CCI values, as well as with lower non-hemolytic febrile transfusion reactions [19]. More recently, Singh et al. have compared transfusion outcomes of single-donor apheresis, BC and PRP platelets, and reported comparable CCI and percentage of platelet recovery with either product. Potential bias in that study was patient heterogeneity and unclear separation among prophylactic or therapeutic platelet transfusions [14].

A major finding in our retrospective study is a significantly higher percentage of efficacious transfusions (i.e.

Table 3. Bleeding complications in both patient groups.

Characteristics	PRP-PCs	BC-PCs	p Value
Number of patients	25	27	
Bleeding during the study			0.14
Grades 0–1	17(68)	23(85)	
Grade \geq 2	8(32)	4(15)	
Days from platelet transfusion to first bleeding grade \geq 2	5.6(3.6–8.1)	6.7(2.5–12.5)	0.60
Deaths from hemorrhage	0	1	

Note: All values are shown as median and interquartile range or absolute number and percentage.

in 24-h CCI > 4500) for BC-PCs than for PRP-PCs transfusions (70% vs. 53%), and this result was corroborated in the multivariate analysis. As our transfusion policy and transplant management were not significantly modified within the study time, these features could have had negligible influence on transfusion efficacy. Moreover, the transfusion benefit associated with BC-PCs is unlikely to be due to major differences in patient characteristics over time (2005–2007 vs. 2008–2011), as the efficacy of AF-PCs transfusions was similar in BC-PCs and PRP-PCs patient groups.

Other variables identified in the multivariate analysis as independently associated with higher transfusion efficacy were the absence of splenomegaly, GvHD prophylaxis with CsA-MTX and diagnosis of AL.

These findings are in agreement with previous studies showing that splenomegaly reduces PPI in oncohematology patients [8,20]. It has also been shown that GvHD prophylaxis may influence transfusion efficacy. Thus, Besinguer et al. have reported that patients receiving MTX alone for GvHD prophylaxis require significantly more units of platelets than those receiving CsA or CsA-MTX combination [21]. In addition, Ishida et al. showed that high serum levels of tacrolimus or CsA strongly associate with a poor transfusional response [22]. In contrast to our finding, a previous study has reported negligible influence of AL diagnosis in CCI, but this investigation was not restricted to prophylactic transfusions as herein [20].

In the last two decades, bleeding outcomes have become the primary endpoint of platelet transfusion studies. In line with results published by Rebullá [23], the most common bleeding event in our study was mild skin bleeding, although the most frequent grade ≥ 2 bleeding complication was gastrointestinal bleeding. Overall, we observed a low rate of bleeding (15–32%) in our study. Of mention, a high variability in bleeding rate (10–70%) has been reported in the different clinical trials [2,3,23] which may be explained by the way the investigators have recognized and graded bleeding events [24]. While, as stated above, transfusion of BC-PCs favors higher platelet count increment, it is remarkable that this variable showed no apparent influence in patient bleeding outcomes. Similarly, secondary analyses of PLADO study demonstrated that transfusing apheresis platelets, ABO-identical platelets or platelet stored ≤ 3 days benefit platelet count increment, but these variables had no significant effect in time to bleeding events' grade ≥ 2 [9].

An unexpected finding was a higher number of RBCT in BC-PCs, despite these patients showed less bleeding complications. A sub-analysis of the patients in the TOPPs study who underwent chemotherapy or AHCT showed that patients receiving prophylactic platelet transfusions had significantly lower number of bleeding complications than those in the no-prophylaxis arm. However, this finding did not associate with

significantly lower number of RBCT [25]. These results suggest that multiple variables are involved in RBCT requirement in the ASCT setting [26]. Further studies, beyond the scope of this investigation, are needed to assess the role of platelet transfusion in the complex relationship of RBCT and bleeding.

An additional benefit observed in this study was the reduction in donor exposure with each BC-PCs transfusion (five donors vs. six in the PRP-PCs group) during the engraftment period. This small, but significant, reduction may provide additional protection to patients toward pathogen infection and potentially towards allo-immunization. A real estimation of such potential benefit would require a randomized clinical trial that would be troublesome to perform nowadays. Of mention, the TRAP study showed no difference in allo-immunization rate between leukoreduced single-donor (i.e. apheresis) platelets and leukoreduced pooled random-donor platelet concentrates [8]. Later, a meta-analysis of studies comparing transfusion of different WBDP drew no conclusions regarding allo-immunization and refractoriness outcomes [13].

We ought to recognize some limitations in this study. First, it is a retrospective study and data analysis is based on the review of medical records. Second, most patients in both BC-PCs and PRP-PCs groups received AF-PCs sporadically, if transfusion was required and WBDP were not available. Yet, the number of AF-PC transfusions in both groups was similar. Third, although our transfusion criteria and patient management are thought to be similar along the full study period (2005–2011), some variables such as the Amphotericin B administration was found to be higher in BC-PCs transfusion period. The use of this drug has been described to have a negative effect on CCI [27], which could by no means be discarded in our study. Yet, in our study, Amphotericin B administration was present in only 12% of the BC-PCs transfusions, and this platelet product was associated with higher platelet increments than PRP-PCs. Finally, the uncertainty that transfusion reactions were systematically reported in clinical records prevented us from comparative analysis of such events in the two patient groups.

Conclusions

In summary, this retrospective study shows that transfusion of BC-PCs, in comparison with PRP-PCs transfusion, favors superior post-transfusion platelet count increments and reduced mildly, but significantly, donor exposure for WBDP transfusion episodes. However, BC-PCs is equivalent to using PRP-PCs in terms of prevention of major bleeding complications in AHCT patients. We further confirm that patient clinical conditions such as the type of disease, splenomegaly and GvHD prophylaxis management, play an

important role in transfusion outcome and should be considered in estimating the patient bleeding risk, irrespective of the platelet product transfused. Identification of increased bleeding conditions may change our transfusion practice from room-temperature-stored platelets towards other type of platelets, e.g. refrigerated platelets, which may be more beneficial in patients with high bleeding risk.

Acknowledgements

We thank our clinical and laboratory colleagues at the Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer and Centro Regional de Hemodonación, for their help.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

Research by the group of JR is supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI17/01311, CB15/00055) and Fundación Séneca (19873/GERM/15).

ORCID

Hermógenes Fernández-Muñoz  <http://orcid.org/0000-0002-1898-8200>

José Miguel Rivera-Caravaca  <http://orcid.org/0000-0003-0492-6241>

María L. Lozano  <http://orcid.org/0000-0003-3148-7037>

José Rivera  <http://orcid.org/0000-0003-4225-6840>

References

- [1]. Estcourt L, Stanworth S, Doree C, et al. Prophylactic platelet transfusion for prevention of bleeding in patients with haematological disorders after chemotherapy and stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;5:CD004269.
- [2]. Slichter SJ, Kaufman RM, Assmann SF, et al. Dose of prophylactic platelet transfusions and prevention of hemorrhage. *N Engl J Med*. 2010;362(7):600–613.
- [3]. Stanworth SJ, Estcourt LJ, Powter G, et al. A no-prophylaxis platelet-transfusion strategy for hematologic cancers. *N Engl J Med*. 2013;368(19):1771–1780.
- [4]. Andreu G, Vasse J, Sandid I, et al. Use of random versus apheresis platelet concentrates. *Transfus Clin Biol*. 2007;14(6):514–521.
- [5]. Thiele T, Alt-Mayer T, Greinacher A, et al. Implications of a switch to a 100% apheresis platelet supply for patients and for blood donors: a risk benefit analysis. *Vox Sang*. 2016;111(4):350–356.
- [6]. Rivera J, Lozano ML, Vicente V. In vitro changes of platelet parameters: lessons from blood banking. *Methods Mol Biol*. 2004;273:57–72.
- [7]. Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang*. 2005;88(3):153–163.
- [8]. Slichter SJ, Davis K, Enright H, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*. 2005;105(10):4106–4114.
- [9]. Triulzi DJ, Assmann SF, Strauss RG, et al. The impact of platelet transfusion characteristics on posttransfusion platelet increments and clinical bleeding in patients with hypoproliferative thrombocytopenia. *Blood*. 2012;119(23):5553–5562.
- [10]. Van der Planken MG, Vertessen F, Mortelmans E, et al. The evolution of platelet procoagulant activity of remnant platelets in stored platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma method and the buffy coat method. *Ann Hematol*. 1999;78(1):1–7.
- [11]. Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, et al. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haematol*. 1997;98(1):86–95.
- [12]. Semple E, Bowes-Schmidt A, Yi Q-L, et al. Transfusion reactions: a comparative observational study of blood components produced before and after implementation of semiautomated production from whole blood. *Transfusion*. 2012;52(12):2683–2691.
- [13]. Heddle NM, Arnold DM, Boye D, et al. Comparing the efficacy and safety of apheresis and whole blood-derived platelet transfusions: a systematic review. *Transfusion*. 2008;48(7):1447–1458.
- [14]. Singh RP, Marwaha N, Malhotra P, et al. Therapeutic efficacy of different types of platelet concentrates in thrombocytopenic patients. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2008;24(1):16–22.
- [15]. Van der Meer PF. Platelet concentrates, from whole blood or collected by apheresis? *Transfus Apher Sci*. 2013;48(2):129–131.
- [16]. Rivera J, Sánchez-Roig MJ, Rosillo MC, et al. Stability of glycoproteins Ib/IX and IIb/IIIa during preparation and storage of platelet concentrates: detection by binding assays with epitope-defined monoclonal antibodies and physiological ligands. *Vox Sang*. 1994;67(2):166–171.
- [17]. Plaza EM, Céspedes P, Fernández H, et al. Quality assessment of buffy-coat-derived leucodepleted platelet concentrates in PAS-plasma, prepared by the OrbiSac or TACSI automated system. *Vox Sang*. 2014;106(1):38–44.
- [18]. Bishop JF, Matthews JP, Yuen K, et al. The definition of refractoriness to platelet transfusions. *Transfus Med*. 1992;2(1):35–41.
- [19]. Anderson NA, Gray S, Copplesstone JA, et al. A prospective randomized study of three types of platelet concentrates in patients with haematological malignancy: corrected platelet count increments and frequency of nonhaemolytic febrile transfusion reactions. *Transfus Med*. 1997;7(1):33–39.
- [20]. Bishop JF, McGrath K, Wolf MM, et al. Clinical factors influencing the efficacy of pooled platelet transfusions. *Blood*. 1988;71(2):383–387.
- [21]. Bensinger W, Petersen FB, Banaji M, et al. Engraftment and transfusion requirements after allogeneic marrow transplantation for patients with acute non-lymphocytic leukemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant*. 1989;4(4):409–414.
- [22]. Ishida A, Handa M, Wakui M, et al. Clinical factors influencing posttransfusion platelet increment in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: a prospective analysis. *Transfusion*. 1998;38(9):839–847.

- [23]. Rebulla P, Finazzi G, Marangoni F, et al. The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukemia. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto. *N Engl J Med.* 1997;337(26):1870–1875.
- [24]. Estcourt LJ, Heddle N, Kaufman R, et al. The challenges of measuring bleeding outcomes in clinical trials of platelet transfusions. *Transfusion.* 2013;53(7):1531–1543.
- [25]. Stanworth SJ, Estcourt LJ, Llewelyn CA, et al. Impact of prophylactic platelet transfusions on bleeding events in patients with hematologic malignancies: a subgroup analysis of a randomized trial (CME). *Transfusion.* 2014;54(10):2385–2393.
- [26]. Liesveld J, Pawlowski J, Chen R, et al. Clinical factors affecting engraftment and transfusion needs in SCT: a single-center retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(5):691–697.
- [27]. Böck M, Muggenthaler KH, Schmidt U, et al. Influence of antibiotics on posttransfusion platelet increment. *Transfusion.* 1996;36(11–12):952–954.

Quality assessment and transfusion efficacy of buffy coat-derived platelet concentrates washed with platelet additive solution

Hermógenes Fernández-Muñoz^{1,2}, Cristina Castilla-Llorente^{1,3}, Eva M. Plaza¹, Cristina Martínez-Millán¹, Inmaculada Heras¹, Pastora Iniesta¹, María L. Amigo¹, Francisca Ferrer-Marin¹, María J. Candela¹, María L. Lozano¹, Vicente Vicente¹, José Rivera¹

¹Haematology and Medical Oncology Service, Morales Meseguer University Hospital, Regional Blood Donation Centre, University of Murcia, IMIB-Arrixaca, CIBERER, Murcia, Spain; ²Haematology and Blood Therapy Service, "Rafael Méndez" University Hospital, Lorca, Spain; ³Haematology Service, "Gustave Roussy" Institute, Villejuif, France

Background. Transfusion of washed platelet concentrates (W-PC) is recommended for some patients, such as those who have had previous severe allergic transfusion reactions. However, we still lack a standardised method for preparing these products. Here, we assessed the effect of a manual washing procedure on *in vitro* platelet quality and on the transfusion efficacy of W-PCs.

Materials and methods. Buffy coat-derived W-PC in Composol solution were prepared by one-step centrifugation. Platelet activation and function were evaluated before and after washing by means of: (i) CD62 expression by flow cytometry; (ii) platelet aggregation (LTA); and (iii) the VerifyNow® P2Y12 test. A pilot prospective transfusion study was carried out in 11 onco-hematology patients receiving, in a short time, two consecutive transfusions: one with standard PC (S-PC) and one with W-PC. The post-transfusion platelet increment, the 1 h and 24 h corrected count increment (CCI) and occurrence of bleeding events were used as indices of transfusion efficacy.

Results. Platelet recovery in W-PC was 84.8±5.4%. Washing slightly increased platelet activation in W-PC vs pre-washed samples (% CD62+ platelets 23.6±7 vs 14.8±1; p=0.03). As compared to prewash samples, platelet reactivity of W-PC as measured by VerifyNow® P2Y12 was significantly lower with ADP (PRU 32.2±37.7 vs 4.2±2.4, p=0.027), but similar using TRAP. Platelet aggregation responses to TRAP, collagen, ristocetin and arachidonic acid were maintained in W-PC. The pilot transfusion trial showed similar 1 h (13.5±5.6 vs 11.5±7.3, p=0.49) and 24 h (11±7.2 vs 9±6.5, p=0.48) CCI for S-PC and W-PC. Transfusion of W-PC was not associated with an increased number of bleeding events.

Discussion. We have set up a simple method to obtain buffy-coat-derived W-PC, which has minor effects on *in vitro* platelet quality and transfusion effectiveness. This procedure can be easily implemented in transfusion centres for on-demand preparation of washed platelets.

Keywords: washed platelet concentrates, washed platelet function, washed platelet transfusion, VerifyNow® system.

Introduction

Allergic transfusion reactions are among the most frequent non-haemolytic adverse effects of blood component transfusions, with incidence rates varying from about 0.15% for plasma and red cell concentrates up to 5% for platelet transfusions^{1,2}. Although the pathophysiology of allergic transfusion reactions remains to be fully elucidated, plasma proteins such as IgA or haptoglobin, food allergens and inflammatory cytokines and chemokines, which accumulate in blood products during storage, have appeared as major mediators of this transfusion complication¹. Even though allergic transfusion reactions are rarely serious, their prevention is desirable because they would add

unnecessary suffering to patients. Often, prophylactic treatment with anti-histamines is used to prevent allergic reactions to platelet transfusions, despite there not being conclusive evidence regarding the preventive value of these drugs^{1,3}. On the other hand, plasma reduction and component washing has been shown to be effective in reducing, by as much as 10-fold, the rate of allergic transfusion reactions in patients receiving platelet transfusions^{2,4}. Thus, these blood banking techniques might be the new standard of care for all patients or at least for those cases with recurrent allergic transfusion reactions.

Essentially, platelet washing is a process aimed at replacing the donor's plasma in the platelet product

by physiological saline or a platelet additive solution. Unfortunately, this washing process is time-consuming, needs qualified personnel and is hampered by a lack of an international quality standard^{5,6}.

The aim of our study was to validate a simple protocol for washing standard buffy coat-derived platelet concentrates with platelet additive solution. To do this, we evaluated the effects of washing on *in vitro* activation and functional status of platelets, and compared the transfusion outcome of standard and washed platelets in a cohort of patients who received two platelet transfusions in a short time interval.

Materials and methods

Preparation, washing, and sampling of platelet concentrates

Leucodepleted platelet concentrates (PC) were prepared by pooling five isogroup ABO fresh buffy-coats and 300 mL CompoSol® platelet additive solution (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany), using the OrbiSac system (Terumo BCT Europe N.V, Zaventem, Belgium), essentially as detailed elsewhere⁷. Upon preparation these PC were left without agitation for about 1 h and then stored in a standard blood bank PC incubator (Helmer Inc, Noblesville, IN, USA) set at 22 °C with moderate flat-bed shaking (60 cycles/min) until use for platelet transfusion within 5 days.

The control arm of the study included 11 standard PC (S-PC) which were stored in a PC incubator, set at 22 °C with continuous, gentle agitation and distributed for transfusion to selected patients within 5 days of preparation (mean storage 2.64 ± 1.36 days). On the day of transfusion, these PC were sampled in a sterile manner for *in vitro* evaluation as described below. The investigational arm of the study included another 11 S-PC that were stored equally to those in the control arm (mean storage 2.36 ± 0.66 days) but that, on the day of transfusion, were submitted to a washing process to obtain washed PC (W-PC). Briefly, 300 mL of CompoSol were transferred to the PC using a sterile connecting device (TSCD®-II, Terumo BCT Europe N.V.). The empty CompoSol bag was substituted by a transfer bag (2L Bag BB*J200BM, Terumo BCT Europe N.V.), again using the TSCD®-II, and the PC-transfer sealed bag set was centrifuged at 1,800 g for 9 min, at 22 °C in a Sorvall™ RC 3BP centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). The PC supernatant was then carefully transferred into the transfer bag using a manual plasma expressor and a new 300 mL CompoSol bag was connected to the PC with TSCD®-II. The CompoSol solution was added to the PC and the empty bag removed by means of a thermic tube sealer device (T-SEAL II; Terumo BCT Europe). The resultant W-PC was left without agitation for 45 min and then

stored for 1 h in the PC incubator with flat-bed shaking (60 cycles/min) to allow platelet resuspension. Finally, the W-PC were distributed for transfusion to selected patients within 4 h of preparation.

These W-PC units were sampled before and after washing for *in vitro* platelet evaluation as described below. In two out of the 11 W-PC, the protein concentration in the PC supernatant was determined before and after washing with an automatic analyser (Cobas 701; Roche España, Barcelona, Spain) and a 90% reduction was found (0.3 vs 2.7 mg/dL before washing).

Test and assays

In vitro studies were performed on all PC samples and post W-PC on the day of transfusion to patients. Cell counts in the PC samples were determined by means of an electronic particle counter (STKS, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

For the platelet functional studies, 5 mL of PC samples were obtained aseptically and centrifuged (1,000 g, 10 min) before removing the platelet-poor supernatant. The platelet pellet was gently re-suspended in the appropriate volume of AB fresh-frozen plasma, in order to adjust the platelet count to 300×10^9 platelets/L. A single batch of AB fresh-frozen plasma was used in the study: the batch was stored at -80 °C and the required aliquot was thawed at 37 °C immediately before use.

Platelet aggregation assays and flow cytometric assessment of platelet activation (P-Selectin [CD62P]), were performed in the platelet suspensions obtained from the PC as described previously⁷. The agonists and concentrations used in aggregations were: 1.6 mM arachidonic acid (AA; DiaMed, Cressier, Switzerland), 25 µM thrombin receptor activating peptide (TRAP; Sigma-Chemical, Madrid, Spain), 1.25 mg/mL ristocetin (Sigma-Chemical) and 2 µg/mL collagen (Menarini Diagnostics, Barcelona, Spain).

Platelet aggregation was also measured using a VerifyNow® system (Accumetrics, San Diego, CA, USA). Briefly, blood was reconstituted *in vitro* using platelets obtained from samples before and after washing, mixed with AB plasma and O red blood cells and were added to P2Y₁₂ cartridges to evaluate platelet aggregation as instructed by the manufacturers.

In vivo studies

We also performed a prospective transfusion study in our Clinical Unit at the Morales Meseguer University Hospital. The study involved 11 patients with thrombocytopenia induced by chemotherapy or due to haematological diseases, who were expected to receive two platelet transfusions in a short period of time. The order of the platelet transfusion type, first W-PC and second S-PC or *vice versa*, was dependent on the

Quality of buffy coat-derived washed platelet concentrates

availability of W-PC in the blood transfusion centre. The primary end-points of the study were post-transfusion platelet increment and 1 h and 24 h corrected count increment (CCI). According to previously described criteria, transfusions were considered to be successful when 1 h and 24 h CCI were at least $7.5 \times 10^9/L$ and $4.5 \times 10^9/L$, respectively^{9,10}. Secondary outcome was bleeding events graded according to the World Health Organisation (WHO) classification¹¹. Patients' medical records were reviewed and clinical factors that might have influenced transfusion efficacy, including fever, sepsis, mucositis or any recognised clinical toxicity, were evaluated according to WHO criteria¹².

This investigation followed the principles of the Helsinki Declaration and was approved by the hospital Ethics Committee. Patients had provided consent to the use of their medical records for research purposes.

Statistical analysis

The results of the different variables analysed are presented as means \pm standard deviations or percentages, as appropriate. The Kolmogorov-Smirnov test was used to check for the normal distribution of data. Differences in the *in vitro* platelet tests between pre- and post-wash PC, and changes in transfusion efficacy between S-PC and W-PC were assessed by paired *t*-tests. Patients' clinical features at the time of the first and second transfusions were compared by Fisher's exact test. *p*-values <0.05 were accepted as statistically significant. All analyses were carried out using a software programme (SPSS for Windows, Ver. 15; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Effect of platelet washing on cell recovery and platelet function

The general characteristics of the PC are summarised in Table I. There were not significant differences in any parameter between S-PC and pre-processing W-PC, suggesting no bias in the selection of standard PC to be washed. As shown, the washing procedure led to a moderate but significant loss of platelets, providing a recovery of approximately 85% of the original platelet content, in a similar product volume.

Under our experimental conditions, washing also induced a mild but significant increase in the platelet activation status, as assessed by P-selectin expression in unstimulated platelets. Moreover, washed platelets displayed a slightly lower capacity to release P-selectin from α -granules upon stimulation with TRAP (Table I).

Light transmission aggregometry, the gold standard for testing platelet function¹³, demonstrated that the washing procedure had negligible effects on the functional status of the PC. Indeed, for all tested agonists,

washed platelets showed maximal aggregation responses that were similar or even slightly higher than those of their non-washed counterparts. In contrast, in aggregation assays with the point-of-care VerifyNow[®] test we found that platelet aggregability induced with the weak agonist ADP, but not with iso-TRAP, was significantly impaired after the washing process (Table I).

Effect of platelet washing on transfusion efficacy.

The transfusion efficacy of platelets obtained with our simple washing procedure was assessed in a small cohort of 11 onco-haematology patients (9 men and 2 women), expected to require at least two consecutive transfusions in a short period of time: Two of these patients had received induction chemotherapy for acute myeloid leukaemia, one was under treatment for a secondary acute myeloid leukaemia after an allogeneic transplant, four had received chemotherapy for autologous transplantation and three for allogeneic progenitor cell transplants, and one patient had a myelodysplastic syndrome with severe thrombocytopenia. The median age of the patients was 55.6 ± 8.5 years, and their median body surface was 1.86 ± 0.24 m².

Table I - *In vitro* characteristics of standard and washed platelet concentrates.

Parameter	Standard	Washed	
		Pre-manipulation	Post-manipulation
Volume (mL)	365 \pm 20	366 \pm 11	353 \pm 20*
<i>Platelets</i>			
($\times 10^9/L$)	1,090 \pm 100	1,152 \pm 161	1,009 \pm 113#
($\times 10^9/pool$)	397 \pm 30	423 \pm 63.6	356 \pm 41#*
<i>CD62 (% platelet+)</i>			
Basal	18.7 \pm 7	14.8 \pm 1.8	23.6 \pm 7#
TRAP-stimulation	88.7 \pm 10.8	88.6 \pm 6.8	85.0 \pm 7.3#
<i>VerifyNow[®] P2Y12 (PRU)</i>			
ADP-induced		32.2 \pm 37.7	4.2 \pm 2.4#
TRAP-induced		275.2 \pm 55.9	263.3 \pm 63.3
<i>% maximal aggregation</i>			
1.6 mM AA	87.2 \pm 4.9	87.3 \pm 6.1	83.5 \pm 9.3
1.25 mg/mL ristocetin	93.9 \pm 6.6^*	94.9 \pm 6.8^*	102.8 \pm 6.3
2 μ g/mL collagen	87.7 \pm 8.7	84.7 \pm 8.2	90.3 \pm 11.5
25 μ M TRAP	89.0 \pm 9.1^*	91.0 \pm 5.8^*	95.2 \pm 3.3

All values are mean \pm standard deviation from 11 different units. A Student's *t*-test was used to compare standard platelet concentrate (S-PC) values and pre-manipulation washed platelet concentrate (W-PC) values with post-manipulation W-PC values. * *p* <0.05 vs S-PC; # *p* <0.05 vs pre-manipulation W-PC. ^*p* <0.05 vs post-manipulation W-PC. AA: arachidonic acid; ADP: adenosine diphosphate; PRU: P2Y12 reaction units; TRAP: thrombin receptor activating peptide.

In ten out of the 11 patients included, the first platelet transfusion was a W-PC and the second was a S-PC. The mean interval between the first and second transfusions was 3.2±1.9 days. As summarised in Table II, the review of clinical records demonstrated that clinical status of the patients before the first and second transfusions was similar with regards to variables that could influence transfusion efficacy, such as fever, diarrhoea, mucositis, sepsis or active bleeding. We found that 55% of patients entering the study had mucositis the day of transfusion, with no statistical differences in the severity of mucositis before transfusion of S-PC or W-PC. Two patients suffered from oral bleeding secondary to grade 2 mucositis and grade 1 cutaneous bleeding the day that they were transfused with W-PC. Meanwhile, one patient suffered from cutaneous bleeding (grade 1) and two had oral bleeding secondary to mucositis (grade 2) the day they were transfused with S-PC (Table II).

There were not a statistical difference between the duration of storage of S-PC and W-PC before transfusion (2.6±1.4 days for S-PC vs 2.3±0.7 days for W-PC; p=0.56).

Pre- and post-transfusion platelet counts in the patients, platelet count increments and 1 h and 24 h post-transfusion CCI are shown in Table III. The patients

platelet counts were similar before transfusion of either S-PC or W-PC (18.5×10⁹/L vs 16.9×10⁹/L, respectively). Overall, we observed a tendency to a slightly reduced transfusion efficacy for W-PC, although the difference only reached statistical significance for the 1 h post-transfusion platelet count (Table III). Both 1 h and 24 h CCI, and the percentages of successful transfusions at 1 h (CCI >7.5×10⁹/L) and 24 h (CCI >4.5×10⁹/L), were slightly higher with S-PC than with W-PC (Table III).

It is worth noting that none of the patients in this small study had adverse transfusion reactions or septic events after being transfused with either S-PC or W-PC.

Discussion

Transfusion of washed platelets is indicated for patients with previous allergic transfusion reactions or IgA or haptoglobin deficiency. On-demand preparation of this platelet product is hampered by the lack of international recommendations^{5,6}. In this study we validated an in-house method to obtain washed platelets for clinical purposes. The procedure is simple, takes only about 2 h, and does not require very specialised personnel. Once validated, the protocol has been easily implemented for its general use by trained technicians in the blood component department of our Blood Transfusion Centre.

Table II - Clinical status and bleeding complications in patients transfused with standard or washed platelets.

	Platelets		p-value
	S-PC	W-PC	
<i>Fever</i>			1
No	8(83)	8(83)	
Yes	3(27)	3(27)	
<i>Diarrhoea</i>			1
No	10(91)	11(100)	
Yes	1(9)	0	
<i>Mucositis</i>			0.68
No	5(46)	5(46)	
Grade 1	1(9)	2(18)	
Grade 2	1(9)	0	
Grade 3	2(18)	4(36)	
Grade 4	2(18)	0	
<i>Bleeding</i>			0.81
No	8(73)	9(82)	
Yes	3(27)	2(18)	
<i>Sepsis</i>			
No	11(100)	11(100)	

All values are expressed as percentages (%) from 11 patients. S-PC: standard platelet concentrates; W-PC: washed platelet concentrates.

Table III - Assessment of transfusion efficacy of standard and washed platelets.

Parameter	Platelets		p-value
	S-PC	W-PC	
Total platelet transfusions (n)	11	11	
Pre-transfusion platelet count (×10 ⁹ /L)	18.5±7.3	16.9±8.7	0.41
1 h post-transfusion platelet count (×10 ⁹ /L)	49.1±16.2	42±18	0.02
24 h post-transfusion platelet count (×10 ⁹ /L)	44.1±23	36.1±15.5	0.10
1 h PPI (×10 ⁹ /L)	30.6±16	24.8±19.5	0.06
24 h PPI (×10 ⁹ /L)	25.6±18.9	19.2±16.6	0.14
1 h CCI (×10 ⁹ /L)	13.5±5.6	11.5±7.3	0.25
24 h CCI (×10 ⁹ /L)	11.1±7.2	9±6.5	0.24
Transfusions with 1 h CCI >7.5×10 ⁹ /L (n, %)	10 (91%)	7 (64%)	0.31
Transfusions with 24 h CCI >4.5×10 ⁹ /L (n, %)	10 (91%)	9 (82%)	1.00

Values are expressed as mean ± standard deviation or percentages (%) from 11 patients, as appropriate. S-PC: standard platelet concentrates; W-PC: washed platelet concentrates; PPI: post-transfusion platelet increment; CCI: corrected count increment.

Quality of buffy coat-derived washed platelet concentrates

Our platelet washing protocol is performed in a standard blood bank centrifuge, similarly to most methods previously described¹⁴⁻¹⁷. In contrast, few others have evaluated washed platelets processed with semi-automatic devices, such as a Cobe 2991 (Terumo Bct, Tokyo, Japan) or ACP215 (Haemonetics Co, Braintree, MA, USA)¹⁸⁻²⁰. The use of this equipment may require more specialised personnel. Of mention, the COBE 2991 is no longer on the market. Recently, a hollow-fibre column system has been adapted for the preparation of W-PC, with acceptable maintenance of *in vitro* platelet function²¹.

A major drawback of platelet washing procedures in a clinical setting is platelet loss. Previous reports of washing platelets by means of a single centrifugation step have shown losses from 4 to 18% of the initial platelets^{14,17}, while those using a two-step centrifugation registered platelet losses of 26 to 40%^{15,18,21-23}. In the present study the mean percentage of recovery for W-PC was as high as 85%, thus being acceptable for transfusion purposes.

Another potential detrimental effect of washing platelets is impairment of platelet function. In our *in vitro* platelet quality assessment we found that washed platelets essentially maintained their aggregability potential, except with mild agonists such as ADP. These findings are in accordance with previous reports showing unaffected aggregation response to collagen in washed platelets, while their aggregation response to ADP or epinephrine was severely impaired^{15,16}. While VerifyNow[®] is currently widely used for the purpose of antiplatelet therapy monitoring⁹, this is the first study showing the potential utility of this point-of-care device for evaluating platelet products in a blood bank setting. This device showed that washing platelets had a detrimental effect on the platelets' response to weak agonists, while not interfering with their reactivity towards a potent agonist, thrombin.

In contrast to a few earlier studies in which washing induced extremely marked platelet activation^{15,19}, this parameter was very mildly affected in our washed platelets. In addition, the exposed P-selectin on the platelet membrane surface upon TRAP stimulation was similar before and after washing, again suggesting a minor effect of washing on thrombin-mediated platelet activation and secretion. It is noteworthy that Rignwald *et al.* also reported a low level of spontaneous activation in washed platelets, despite using a protocol involving two centrifugation steps¹⁵. As they reported a very high platelet loss during washing, there was concern about whether activated platelets had been selectively lost. Nevertheless, these discrepancies among studies suggest that washing procedure variability (centrifugation steps, washing solutions, etc.) has a profound impact on platelet activation^{14,16,19,21}.

Blood Transfus DOI 10.2450/2017.0277-16

A major issue in clinical transfusion settings is whether loss of platelets and altered platelet function during product processing would have a significant detrimental effect on transfusion efficacy. Indeed, in the present study, we observed a trend to a slightly higher transfusion efficacy for S-PC transfusions compared to W-PC transfusion, and yet only the 1-h post-transfusion platelet count was statistically significantly different (Table III). Importantly, more than 80% of the W-PC transfusions were defined as effective transfusions at 24 h, and transfusion of washed products was not associated with an increased number of bleeding events. Concordantly with these findings, Azuma *et al.* reported that washed and/or plasma-reduced apheresis platelet products prevented allergic reactions and non-haemolytic reactions in 11 out of 12 patients, provided adequate 1 h and 24 h CCI, and were associated with no clinical bleeding⁴. In contrast, Karafin *et al.* reported major differences, from 32.2 to 50.6%, in 1 h and 24 h CCI between standard and washed apheresis platelets, which may have been due to high platelet loss in their washing protocol and/or to unrecorded complications in the recipients, such as splenomegaly and fever²³.

The design used in this study, two platelet transfusions in the same patient in a short time, was intended to minimise the effect of the patients' clinical status on the transfusion efficacy while maximising the influence of the platelet product itself. Nevertheless, one limitation of this study is that the number of patients evaluated was low and larger series are needed to ensure the clinical efficacy of platelets washed according to our protocol. Moreover, the low prevalence of patients with previous allergic transfusion reactions or IgA or haptoglobin deficiencies make it unfeasible to perform the study in those patient populations for whom washed platelets are most commonly indicated.

Conclusions

In summary, we have implemented a simple process to prepare washed platelets, with a minor impact on platelet recovery and platelet activation and function. A pilot transfusion study supported the clinical haemostatic efficacy of these washed platelets. Future trials in patients with allergic transfusion reactions or IgA or haptoglobin deficit are needed to evaluate the effectiveness of this product at preventing undesirable transfusion reactions mediated by plasma proteins contained in the PC.

Acknowledgements

We thank our clinical and laboratory colleagues at the Haematology and Medical Oncology Service, Morales Meseguer University Hospital and the Regional Blood Donation Centre for their help in performing this study.

Funding and resources

Research by the group of JR is supported by grants from *Instituto de Salud Carlos III* (PI14/01956 and CB15/00055) and *Fundación Séneca* (19873/GERM/15).

Authorship contributions

JR and HF-M designed the research and wrote the paper. EMP, MJC, MLA, FF-M and JR prepared the platelet concentrates and evaluated their in vitro quality. HF-M, CC-L, CM-M, PI, IH and VV performed the platelet transfusions, recorded and first evaluated clinical parameters. All Authors critically reviewed and approved the final version of the paper.

The Authors declare no conflicts of interest.

References

- 1) Hirayama F. Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. *Br J Haematol* 2013; **160**: 434-44.
- 2) Tobian AA, Savage WJ, Tisch DJ, et al. Prevention of allergic transfusion reactions to platelets and red blood cells through plasma reduction. *Transfusion* 2011; **51**: 1676-83.
- 3) Geiger TL, Howard SC. Acetaminophen and diphenhydramine premedication for allergic and febrile nonhemolytic transfusion reactions: good prophylaxis or bad practice?. *Transfus Med Rev* 2007; **21**: 1-12.
- 4) Azuma H, Hirayama J, Akino M, et al. Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion* 2009; **49**: 214-8.
- 5) Fung MK, Grossman BJ, Hillyer C, et al. *Technical Manual*. 18th ed. Bethesda, MD: AABB Press; 2014.
- 6) Council of Europe-European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*. 18th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2015.
- 7) Plaza EM, Lozano ML, Guiu IS, et al. Evaluation of platelet function during extended storage in additive solution, prepared in a new container that allows manual buffy-coat platelet pooling and leucoreduction in the same system. *Blood Transfus* 2012; **10**: 480-9.
- 8) Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, et al. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 1999; **99**: 620-5.
- 9) Bishop JF, Matthews JP, Yuen K, et al. The definition of refractoriness to platelet transfusions. *Transfus Med* 1992; **2**: 35-41.
- 10) Heddle NM, Arnold DM, Boye D, et al. Comparing the efficacy and safety of apheresis and whole blood-derived platelet transfusions: a systematic review. *Transfusion* 2008; **48**: 1447-58.
- 11) Slichter SJ, Davis K, Enright H, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* 2005; **105**: 4106-14.
- 12) Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; **47**: 207-14.
- 13) Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013; **11**: 1183-9.
- 14) Schoenfeld H, Muhm M, Doepfmer U, et al. Platelet activity in washed platelet concentrates. *Anesth Analg* 2004; **99**: 17-20.
- 15) Ringwald J, Althoff F, Zimmermann R, et al. Washing platelets with new additive solutions: aspects on the in vitro quality after 48 hours of storage. *Transfusion* 2006; **46**: 236-43.
- 16) Tynngård N, Trinks M, Berlin G. In vitro quality of platelets during prolonged storage after washing with three platelet additive solutions. *Vox Sang* 2012; **102**: 32-9.
- 17) Oikawa S, Taguchi T, Endo K, et al. Storage of washed platelets in BRS-A platelet additive solutions based on two types of clinically available bicarbonated Ringer's solutions with different electrolyte concentrations. *Transfus Apher Sci* 2015; **53**: 233-7.
- 18) Kelley WE, Edelman BB, Drachenberg CB, Hess JR. Washing platelets in neutral, calcium-free, Ringer's acetate. *Transfusion* 2009; **49**: 1917-23.
- 19) Veeraputhiran M, Ware J, Dent J, et al. A comparison of washed and volume-reduced platelets with respect to platelet activation, aggregation, and plasma protein removal. *Transfusion* 2011; **51**: 1030-6.
- 20) Oikawa S, Sasaki D, Kikuchi M, et al. Feasibility of a closed-system cell processor (ACP215) for automated preparation of washed platelet concentrates. *Vox Sang* 2012; **102**: 110-5.
- 21) Tanaka S, Hayashi T, Sugaya S, et al. A hollow-fibre column system to effectively prepare washed platelets. *Vox Sang* 2015; **109**: 239-47.
- 22) Tynngård N, Trinks M, Berlin G. Platelet quality after washing: the effect of storage time before washing. *Transfusion* 2010; **50**: 2745-52.
- 23) Karafin M, Fuller AK, Savage WJ, et al. The impact of apheresis platelet manipulation on corrected count increment. *Transfusion* 2012; **52**: 1221-7.

Arrived: 2 October 2016 - Revision accepted: 29 November 2016

Correspondence: José Rivera

Centro Regional de Hemodonación-Universidad de Murcia

Ronda de Garay s/n

Murcia 30003, Spain

e-mail: jose.rivera@carm.es

Blood Transfus DOI 10.2450/2017.0277-16